



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS ( NEUROBIOLOGÍA )**  
**CAMPUS JURIQUILLA**

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTANTES DE LA SECUENCIA LCI  
ADYACENTE AL DOMINIO DEL PORO DEL CANAL HCN2**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

**RICARDO HERNÁNDEZ CENTENO**

**TUTORES PRINCIPALES**

**Dr. Adán Hernández Cortés**

**Dr. Ataúlfo Martínez Torres**

**Instituto de Neurobiología**

**COMITÉ TUTOR**

**Dr. Abimael González Hernández**

**Dr. Rogelio Arellano Ostoa**

**Instituto de Neurobiología**

**Juriquilla, Querétaro, Mayo, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Ricardo Hernández Centeno, cuyo título es: "Caracterización funcional de mutantes de la secuencia LCI adyacente al dominio del poro del canal HCN2" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente

Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

Secretario (Tutor)

Dr. Adán Hernández Cortés

Vocal

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Suplente

Dr. Rogelio Arellano Ostoa

Suplente

Dr. Lenin David Ochoa de la Paz

Aprobado por el Comité Académico

---

Coordinador del Pro

## 1- Resumen

Los canales catiónicos activados por hiperpolarización modulados por nucleótidos cíclicos (HCN), son los responsables de controlar la actividad rítmica de las células de marcapaso del corazón y regular la frecuencia de disparo de las neuronas. Los canales HCN pertenecen a la familia de canales de potasio dependientes de voltaje, sin embargo, a diferencia de estos, los HCN se activan a potenciales hiperpolarizantes generando una corriente entrante. Los HCN son permeables a sodio y potasio, a pesar de contar con la secuencia de aminoácidos (GYG) que forman la estructura del filtro de selectividad a  $K^+$ . Adyacente al filtro de selectividad, se encuentran los residuos LCI, cuya relevancia funcional aún es desconocida. Una de las maneras de estudiar la función de un aminoácido es sustituyéndolo por otro. En el presente trabajo se realizó una triple mutación en el HCN2 de *Xenopus tropicalis*, sustituyendo los residuos LCI por Alaninas (391LCI393 > 391AAA393). Resultados de modelamiento *in silico* sugieren que la triple mutación genera cambios considerables en el poro del canal, además de alteraciones en el C-linker, una estructura que forma parte importante del mecanismo de la compuerta. Posteriormente se hizo la caracterización funcional del mutante (HCN2Tm) utilizando ovocitos de *Xenopus laevis* como sistema de expresión heteróloga y mediante registro utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos. El HCN2Tm mostró cambios en las cinéticas de activación y cierre, reducción en la amplitud de sus corrientes y variaciones en la dependencia a voltaje ya que su  $V_{1/2}$  es más negativo que el obtenido en el HCN2Wt. Los resultados obtenidos sugieren que la secuencia LCI no es suficiente para describir la permeabilidad a  $Na^+$  del HCN2 de *X. tropicalis* debido a que no se encontró un efecto considerable sobre la selectividad, sin embargo, estos aminoácidos pueden estar participando en el mantenimiento de las estructuras que regulan la apertura y cierre de la compuerta del canal HCN2.

## 2- Summary

The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels (HCN), are responsible modulating the rhythmic activity of pacemaker cells of the heart and the firing frequency of the neurons. The HCN channels belong to the family of voltage-dependent channels, but different to these, HCN channels are activated by hyperpolarizing potentials producing an inward current. HCN channels permeates sodium and potassium, even though containing the amino acids sequence (394GYG396) an identical structure of the selectivity filter in potassium channels. Adjacent to the selectivity filter the residues 391LCI393 are located, however its functional relevance is still unknown. One way to study the function of one amino acid is by substitution by another. Here we performed a triple mutation in the HCN2 from *Xenopus tropicalis*, where the LCI residues were replaced by Alanine (391LCI393> 391AAA393). Results from modelling in-silico suggest that the triple mutation generates considerable changes in the pore of the channel, in addition to alterations in the C-linker, an important structure of gating mechanisms. Subsequently, the functional characterization of the mutant (HCN2Tm) was made using *X. laevis* oocytes like heterologous expression and recordings using the voltage-clamp technique with two electrodes. The HCN2Tm showed changes in activation and closed kinetics, reduction in the current amplitudes  $m$  and variations in voltage dependence. The results suggest that the sequence LCI is not enough to describe the  $\text{Na}^+$  permeability of HCN2 from *X. tropicalis* because it had not a significant effect on selectivity, however, these amino acids may be involved in the maintenance of structures regulating the opening and closing gate of the HCN2 channel.

### **3- Agradecimientos**

Este trabajo se realizó en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma donde participaron diversas personas directa e indirectamente, aportando su experiencia, paciencia, opiniones, etc.

Primeramente, a los directores de tesis el Dr. Adán Hernández Cortés y el Dr. Ataúlfo Martínez Torres, mi más amplio agradecimiento por la confianza otorgada para elaborar este trabajo, por su valiosa dirección y apoyo.

Al apoyo otorgado por el CONACyT por la beca No. 774968, así como al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT). Proyecto No. TA200217, otorgado al Dr. Adán Hernández Cortés.

A la Dra. Edith Espino por sus asesorías y a todos los miembros del laboratorio de Neurobiología celular y molecular.

A mi familia por el apoyo incondicional otorgado entendiendo mis ausencias y mis malos momentos

# Índice

	Pág.
1. Resumen	i
2. Summary	ii
3. Agradecimientos	iii
4. Introducción	6
5. Antecedentes	8
5.1. Estructura de los canales HCN	10
5.1.1. Filtro de selectividad	11
5.1.2. Sensor de voltaje	13
5.1.3. Modulación por cAMP	15
5.2. Distribución	16
5.3. Relevancia Funcional	17
6. Hipótesis	20
7. Objetivos	20
7.1. Objetivo general	20
7.2. Objetivos específicos	20
8. Justificación	21
9. Metodología	22
9.1. Generación de mutantes	22
9.2. Transformación en bacterias competentes	23
9.2.1. Extracción de plásmido	24
9.3. Transcripción <i>in vitro</i> de mRNA	25
9.4. Obtención y microinyección de ovocitos	26
9.5. Registro electrofisiológico	26
9.6. Análisis de relación I-V	28

9.7. Análisis estadístico	28
10.Resultado	29
10.1. Modelado <i>in silico</i> del HCN2 de <i>X. tropicalis</i>	29
10.2. Generación del triple mutante y transcripción in vitro del HCN2Wt y Tm	35
10.3. Activación de las corrientes del canal HCN2Wt y Tm	38
11.Discusión	48
12.Conclusiones	53
13.Bibliografía	54
14.Lista de figuras	59
15.Lista de tablas	60



#### 4- Introducción

Los canales HCN son la base molecular que subyace a la actividad de marcapaso del nódulo sinoauricular del corazón y la frecuencia de disparo de las neuronas del sistema nervioso central. Estos canales se activan ante una hiperpolarización de la membrana celular, generando una corriente eléctrica mediada por los cationes monovalentes  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Esta corriente fue identificada por primera vez en células cardíacas del nodo sinoauricular del corazón de conejo y debido a sus características recibió el nombre de corriente *Funny*, posteriormente fue descrita en neuronas del sistema nervioso central donde se le denominó corriente activada por hiperpolarización ( $I_h$ ) (DiFrancesco D, et al., 1986, 1991, 2011).

Los canales HCN pertenecen a la superfamilia de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje ya que su estructura es comparable a la de los canales Kv, Shaker, etc, sin embargo, la modulación por nucleótidos cíclicos y la activación por hiperpolarización les confiere una propiedad que los distingue del resto de los canales de  $\text{K}^+$  activados por voltaje. Algunos de los dominios estructurales que comparten incluyen el sensor de voltaje, seis segmentos transmembranales y la secuencia GYG que compone el filtro de selectividad para  $\text{K}^+$ , adyacente a estos residuos podemos encontrar otra secuencia muy conservada en HCN y que es diferente del resto de los canales de potasio, denominada LCI (Leucina, Cisteína e Isoleucina) (Sartiani et al., 2017).

En mamíferos se encuentran cuatro genes que codifican para cuatro canales HCN con características diferentes cada uno, los cuales son denominados HCN1-4. En términos generales los HCN son activados cuando el potencial de membrana se encuentra entre -40 mV y -80 mV y alcanzan su amplitud máxima cuando el potencial de membrana llega a -100 mV, estos datos pueden variar dependiendo del tipo de HCN y el tejido dónde ejerce su función (Kase e Imoto, 2012). Estos cuatro canales pueden distinguirse debido a que cada uno presenta características muy propias como lo son: variaciones en su sensibilidad al voltaje, cinéticas de activación y desactivación y sensibilidad a adenosín monofosfato cíclico (cAMP) (Chao et al., 2014).

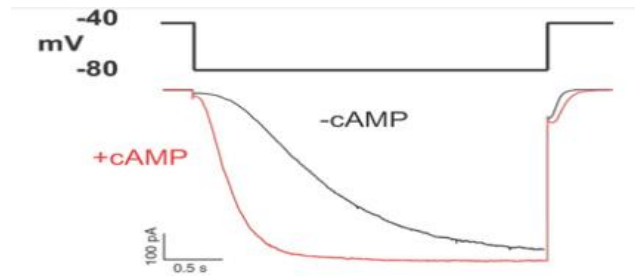
Los HCN tienen un sitio de reconocimiento a nucleótidos cíclicos (CNBD) en el extremo carboxilo terminal intracelular, la unión de nucleótidos cíclicos a este sitio modula la apertura del canal a potenciales menos negativos. En este sentido, el HCN1 es el menos sensible al cAMP mientras que el HCN4 es extremadamente sensible, el HCN2 y HCN3 tienen una sensibilidad a cAMP intermedia (Lewis et al., 2010). La dependencia de voltaje de los canales HCN también es regulada por los niveles de fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) y la proteína TRIP8b, la cual modula la unión del cAMP, además de participar en la migración del canal hasta la membrana de las células (Wainger et al., 2001 y Zolles et al., 2006). Se ha demostrado que algunas alteraciones en la estructura de la proteína derivadas de mutaciones puntuales en sus genes que les codifican tienen importantes repercusiones funcionales y por ende estas modificaciones dan como resultado algunas patologías.

Recientemente en nuestro laboratorio se ha clonado el cDNA de HCN2 proveniente de *X. tropicalis*. El cual se ha empleado para generar mutaciones puntuales en la región del poro específicamente en la secuencia de aminoácidos 391LCI393. Se seleccionaron estos aminoácidos debido a que se encuentran conservados en los 4 genes HCN en todas las especies de vertebrados analizadas. Por tanto, en este trabajo se plantea la generación de una triple mutante de los residuos 391LCI393 por Alaninas, para determinar cuál es su papel sobre la función del canal y si tiene injerencia sobre la selectividad iónica.

## 5- Antecedentes

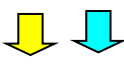
Todas las células están rodeadas por una bicapa lipídica la cual separa su medio interno del externo, embebidos en esta bicapa de lípidos se encuentran ancladas una gran cantidad de proteínas de las cuales podemos destacar las bombas, transportadores y canales iónicos que permiten el transporte de sustancias dentro y fuera de las células (Rosas, 2004). Existe una gran diversidad de canales iónicos especializados para diversas funciones, tal es el caso de los involucrados en los impulsos nerviosos, los que participan en el potencial de reposo, los que responden a ligandos y los que se activan por tensión mecánica, estos permiten el flujo de iones como  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^+$  y  $Cl^-$  (Fanjul, 1998). Dentro de la gran variedad de canales también existen los selectivos a un solo tipo de ion tal es el caso de los canales de  $K^+$  que forman parte de la superfamilia de canales activados por voltaje al igual que los canales HCN.

Los canales HCN generan una corriente de activación lenta que no desensibiliza, contribuyendo a varias funciones; incluyendo la actividad del marcapasos en el corazón, el mantenimiento del potencial de reposo de la membrana y la regulación de la tasa de disparo de neuronas, entre otros (Haitin, et al., 2014). La Figura 1 muestra un registro electrofisiológico de la corriente que subyace a un canal HCN. Como se mencionó anteriormente, la familia de canales HCN consiste en cuatro canales. Los 4 miembros de esta familia pueden diferenciarse ya que presentan características únicas e individuales, por ejemplo: variaciones en su sensibilidad al voltaje, cinéticas de activación y desactivación y modulación por nucleótidos cíclicos. Es interesante que los canales HCN presentan una secuencia de aminoácidos (GYG), similar a los canales de  $K^+$  donde estos residuos forman parte de la estructura de su filtro de selectividad. Sin embargo, los HCN son canales catiónicos no selectivos, ya que permiten el paso  $K^+$  y  $Na^+$  en una proporción 4:1 respectivamente (Postea y Biel, 2011 y Benarroch, 2013). Los canales HCN y a diferencia de los canales de  $K^+$ , presentan una pequeña variación en los aminoácidos que forman el filtro de selectividad a  $K^+$ , los canales HCN contienen una secuencia de aminoácidos muy conservada LCIGYG (Figura 2) diferente a la estructura de los canales de  $K^+$  TTVGYG.



**Figura 1. Corriente generada por canales HCN en células HEK293 en la modalidad de control de voltaje.** Se aplicó un pulso cuadrado hiperpolarizante de voltaje (-80 mV) partiendo de un potencial de mantenimiento de -40 mV. Lo que indujo la generación de una corriente que no se inactiva si el pulso se mantiene. El canal es más sensible al voltaje en presencia de cAMP, la interacción con esta molécula permite la activación del canal a potenciales menos negativos, así como una aceleración en su activación (Kratovich et al., 2016).

Actualmente se cuenta con un modelo estructural de alta resolución de HCN1 humano que propone la existencia de dos sitios de unión a  $K^+$  a diferencia de los cuatro sitios propuesto para canales de  $K^+$ . De estos dos sitios en canales HCN se considera a los residuos IG (localizados en el poro) como formadores parciales de sitios de unión. Además, se sugiere que la permeabilidad a  $Na^+$  se debe a un aumento en el tamaño del poro a causa de un desplazamiento de la tirosina de la secuencia GYG. Por lo tanto, el  $Na^+$  puede fluir a través del filtro de selectividad a favor del flujo de la corriente por su diferencia de gradiente electroquímico (Lee y MacKinnon, 2017).

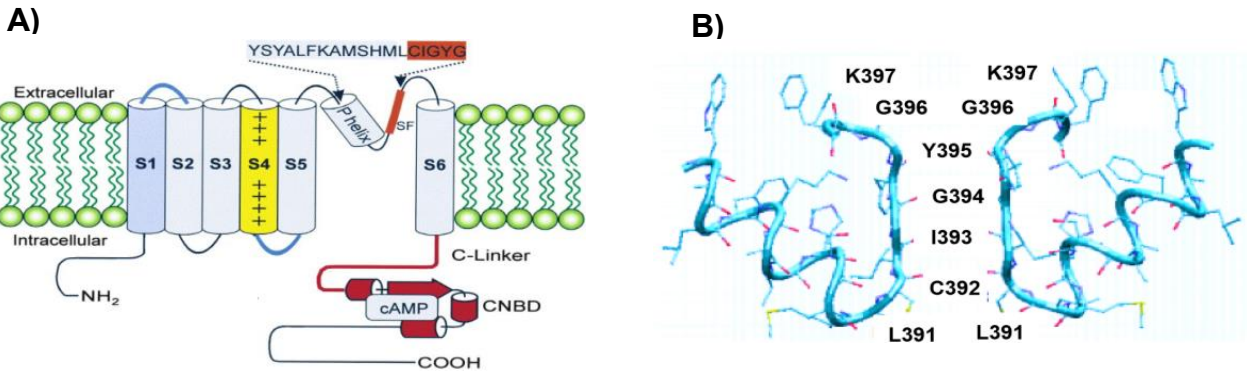


XM_002939769	HCN2 <i>X. tropicalis</i> (GenBank)	ELYSFALFKAMSHML <b>LCI</b> <b>GYG</b> RQAP
-----	HCN2 <i>X. tropicalis</i>	ELYSFALFKAMSHML <b>LCI</b> <b>GYG</b> RQAP
AAC28444.2	<i>Homo sapiens</i>	ELYSFALFKAMSHML <b>LCI</b> <b>GYG</b> RQAP
	<i>Mus musculus</i>	ELYSFALFKAMSHML <b>LCI</b> <b>GYG</b> RQAP
NP_32252.1		
XP_685414.3	<i>Danio rerio</i>	ELYSFALFKAMSHML <b>LCI</b> <b>GYG</b> RQAP
XP_003642915.1	<i>Gallus gallus</i>	ELYSFALFKSMSHML <b>LCI</b> <b>GYG</b> RQAP

**Figura 2. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región del poro del HCN2.** Las especies de vertebrados analizadas conservan el motivo GYG (flecha cian) y los residuos LCI (flecha amarilla) que se encuentran adyacentes.

### 5.1- Estructura de los canales HCN

Los canales HCN son homotetrámeros, es decir que están compuestos de cuatro subunidades homólogas donde cada subunidad se compone de seis segmentos transmembranales (S1-S6), dentro de los cuales se encuentra el dominio S4 que cuenta con aminoácidos cargados positivamente en su estructura y constituyen el sensor de voltaje, los dominios S5 y S6 forman la estructura del poro del canal (Figura 3A) donde se encuentra los residuos que forman el filtro de selectividad para potasio (GYG) que comparten con los canales  $K_v$  y adyacente a estos residuos hacia la parte N-term se encuentra la secuencia LCI (Figura 3B). En el extremo carboxilo terminal se localiza el dominio CNBD que interactúa con cAMP e induce cambios conformacionales en la proteína para modular la apertura del poro (Berrera et al., 2006 y Doyle et al., 1998).



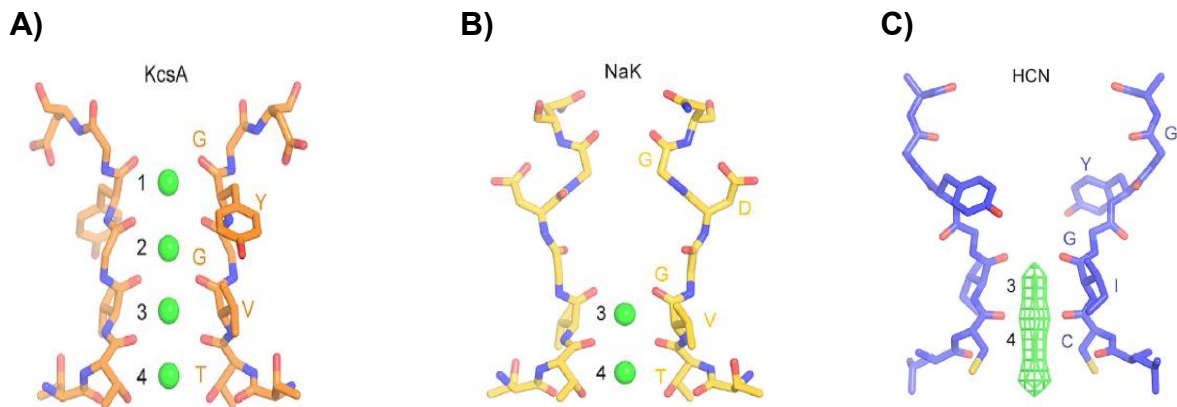
**Figura 3. Características estructurales de los canales HCN.** **A)** Esquema representativo de una subunidad del canal HCN donde se pueden observar los 6 segmentos transmembranales (S1-S6), la estructura que forma el poro del canal conformado por la hélice del poro y los residuos que forman el filtro de selectividad (SF) resaltado en rojo (CIGYG), terminales amino y carboxilo intracelulares, en el carboxilo terminal se encuentra el C-linker y el CNBD (tomado y editado de Schneider y Wahl). **B)** Se muestran 2 subunidades acopladas de spHCN de erizo de mar, con un acercamiento en la región del poro donde se puede observar la posición de los residuos 391LCI393 y 394GYG396 (tomado de Kratochvil et al., 2016).

### 5.1.1- Filtro de selectividad

Estructural y funcionalmente los canales HCN son comparables con los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje y al igual que éstos los HCN cuentan con una secuencia de aminoácidos similar a la que actúa como filtro de selectividad para iones  $K^+$  (T/TV/GYG) en canales de Kv, por ejemplo. En los canales HCN esta secuencia cambia a LCI y solo conserva la secuencia GYG. Se sabe que los aminoácidos que forman el filtro de selectividad a  $K^+$  en los canales de  $K^+$  orientan los átomos de oxígeno de sus grupos carboxilos hacia el vestíbulo del poro formando sitios de unión, más concretamente cuatro sitios de unión, de los cuales es necesario que al menos dos iones estén acoplados a estos sitios para mantener la estructura "rígida", incluyendo interacciones de estos aminoácidos con los residuos del asa del poro (Figura 4A). La razón  $K^+ : Na^+$  de

permeabilidad de los canales de  $K^+$  es de 1000:1. Se considera que el  $Na^+$  no es capaz de permear debido a su tamaño (0.95 Å), al ser más pequeño que un ion  $K^+$  (1.33 Å). Por ejemplo, el filtro en los canales de  $Na^+$  (Figura 4B) permiten el paso del ion con su esfera de hidratación la cual no supera los 5 Å, por lo tanto, no permite el paso de iones  $K^+$  solvatados debido a su tamaño superior. El radio promedio del filtro de selectividad de un canal de  $K^+$  es de aproximadamente 3.5 Å y solo permite el paso de iones que no superen los 1.5 Å por lo tanto los iones no pueden pasar a través del canal a menos que estén deshidratados (Figura 4A). En el espacio extracelular los iones  $K^+$  están rodeados de cuatro moléculas de agua y la energía mínima de deshidratación del  $K^+$  (55 Kcal/mol) es menor a la que se necesita en los iones  $Na^+$  (72 Kcal/mol). De esta manera los oxígenos de los aminoácidos del filtro compensan este gasto de energía y equilibran al ion. Es decir, los cuatro oxígenos que forman un sitio de unión, de alguna manera actúan simulando las moléculas de agua de un ion hidratado por lo tanto lo mantiene estable. Y es debido al tamaño del  $K^+$  que puede interactuar con los átomos de oxígeno adecuadamente, en cambio con iones  $Na^+$  al ser más pequeños, esta interacción no se lleva a cabo correctamente por la diferencia en la distancia entre los oxígenos de los aminoácidos y el  $Na^+$ , al final el ion es repelido (Berg, 2007 y Lee y MacKinnon, 2017). En cambio, los canales HCN permiten el paso de iones  $K^+$  y  $Na^+$  a una razón de 4:1, a pesar de contar con parte de la secuencia que forma la estructura que funciona como filtro de selectividad a  $K^+$ .

En el análisis del cristal del HCN1 en comparación con los canales de  $K^+$ , se observó un aumento del tamaño del poro en la región del filtro de selectividad debido a una rotación de la tirosina causada por una pérdida de interacción con un triptófano localizado en la hélice del poro en los canales de  $K^+$  pero no en los HCN. Esto repercute en la desaparición de dos sitios de interacción con el ion  $K^+$ , sugiriendo que los canales HCN cuentan únicamente con 2 sitios de unión parciales a  $K^+$ , (Figura 4C) (Lee y Mackinnon, 2017). De alguna manera, esto puede explicar el paso de iones  $Na^+$ . Por consiguiente, se hipotetiza que el  $Na^+$  pasa a través del canal en su estado solvatado a favor del flujo de corriente y por la diferencia de su gradiente electroquímico, sin pasar por alguno de los sitios de unión a  $K^+$ , por lo tanto, no puede ser repelido (Lee y Mackinnon, 2017).



**Figura 4. Estructura del filtro de selectividad. A)** Filtro de selectividad a K<sup>+</sup> del canal KcsA, las esferas verdes representan iones K<sup>+</sup> acoplados a cada uno de los cuatro sitios de unión presentes en canales de K<sup>+</sup>. **B)** Filtro de selectividad a Na<sup>+</sup>, del canal de Sodio NaK, las esferas verdes representan iones Na<sup>+</sup> unidos en el filtro de selectividad. **C)** Estructura del filtro de selectividad de los canales HCN, la región verde representa la nube electrónica generada por iones K<sup>+</sup> (tomado de Lee y MacKinnon, 2017).

### 5.1.2- Sensor de voltaje

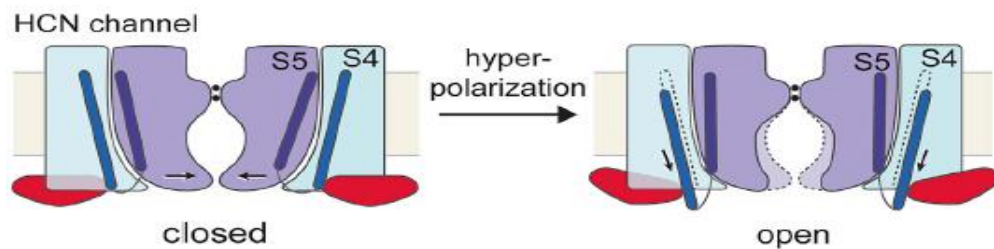
Una de las estructuras con enorme relevancia funcional en los canales dependientes de voltaje es una de sus hélices transmembranales, el segmento S4, que actúa como un sensor de voltaje. Dentro de esta estructura se localizan de 7 a 8 lisinas y argininas colocados de tal manera que se encuentran cada tercera o cuarta posición dentro de la hélice. Esta estructura detecta los cambios en el potencial de membrana y se desplaza al espacio intracelular; el movimiento del S4 se propaga hasta la compuerta del canal causando la apertura (Lee y Mackinnon, 2017)

A diferencia de los canales Kv, los canales HCN cuentan con un sensor de voltaje más grande y su movimiento es hacia el espacio intracelular. El efecto del cambio conformacional del S4 se propaga por el asa S4-S5 hasta el segmento S5 que está



íntimamente ligado al S6 que forma la compuerta del canal (Lee y Mackinnon, 2017) (Figura 5), sin embargo, Cowgill et al., 2019, sugiere que el sensor de voltaje de los HCN tiene la capacidad de favorecer la apertura del poro en cualquier dirección y además el incremento del tamaño del S4 de los HCN no es el principal determinante para la activación por hiperpolarización. También se menciona que existen íntimas interacciones en el sensor de voltaje con otras zonas de la estructura (como la compuerta, el asa S4-S5 y el C-linker) que conducen el canal a un estado inactivo durante la despolarización ocultando su apertura durante esta fase.

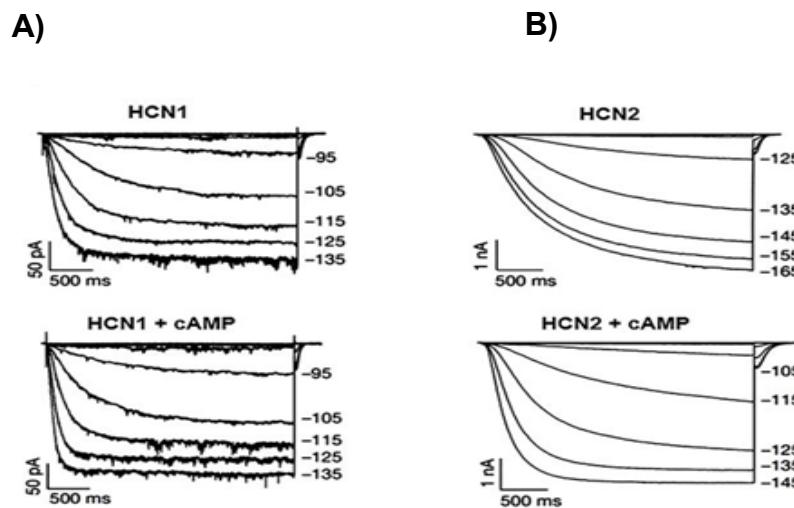
Recientemente por medio de análisis de trayectoria de dinámica molecular se encontró que en canales de  $K^+$  dependientes de voltaje existen otro tipo de interacciones que promueven la apertura. Observaron que no solo es importante la participación del asa S4-S5, sino también ciertas interacciones de aminoácidos en el dominio S4 que conectan con S5 y que se propaga al S6; este tipo de interacciones electromecánicas son una ruta de apertura de la compuerta que permanecía desconocida para la super familia de canales dependientes de voltaje (Fernández-Mariño et al., 2018).



**Figura 5. Compuerta dependiente de voltaje.** Cuando ocurre un cambio en el potencial de membrana, una hiperpolarización en las células, el dominio S4 de los HCN sufre un cambio conformación, un desplazamiento hacia el espacio intracelular. Este movimiento se propaga a través de las estructuras que controlan la compuerta favoreciendo la apertura de los canales HCN (Tomado de Lee y Mackinnon, 2017).

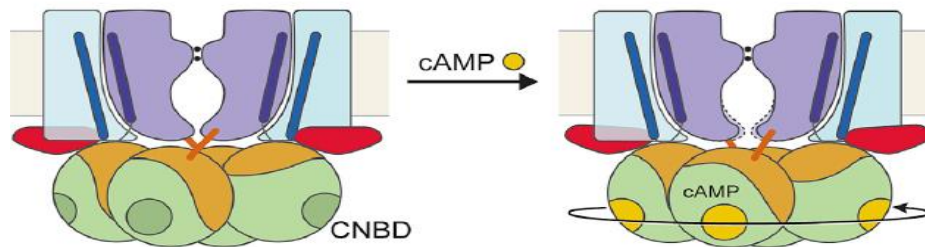
### 5.1.3- Modulación por cAMP

Estos canales son principalmente dependientes de voltajes negativos, es decir se activan o abren cuando ocurre una hiperpolarización. Pero tienen la característica de ser modulados por cAMP, esto, debido a que cuentan con un sitio de unión a nucleótidos cíclicos similar a los canales CNG. Es importante mencionar que no es requisito que el cAMP este unido en su sitio de unión para que ocurra la activación, sin embargo, puede modular la apertura, esto quiere decir que el canal puede activarse a potenciales menos negativos (de -10 a -25 mV en promedio para los genes que presentan mayor sensibilidad a cAMP, como HCN2 y 4; en HCN1 y 3 también ocurre esta modulación pero tienen menor afinidad al cAMP por lo tanto menor efecto), además de modificar las cinéticas de corriente acelerando su activación (DiFrancesco y Tortora,1991) (Figura 6).



**Figura 6. Modulación de la activación de la corriente por cAMP. A)** Trazos de corriente de HCN1 de ratón en configuración de célula completa utilizando ovocitos de *X laevis*, bajo un protocolo de pulsos hiperpolarizantes. Activación del HCN1 en presencia de cAMP bajo condiciones de voltaje similares. **B)** Activación del HCN2 de ratón en ausencia y presencia de cAMP. En ambos casos se observa cómo se modifican las cinéticas de corriente (tomado de Sartiani et al., 2017).

Los canales HCN no presentan selectividad por cAMP ya que otros nucleótidos como cGMP, cUMP y cPMP, pueden modular la activación del canal, aunque con menor afinidad y potencia (Ng. et al., 2016). De acuerdo con Lee y MacKinnon (2017) el CNBD del HCN1 sufre un cambio conformacional cuando se une el cAMP al sitio de unión, provocando una rotación de las cuatro estructuras pertenecientes a cada subunidad, tal efecto se propaga a través del C-Linker hasta la compuerta.



**Figura 7. Modulación por cAMP.** El canal cuenta con cuatro sitios de unión a cAMP (CNBD) pertenecientes a cada subunidad, donde es necesario que la molécula este acoplada a cada uno de los sitios de unión para que se lleve a cabo el cambio conformacional, en este caso una rotación de la parte carboxilo terminal intracelular. Tal efecto se propaga hasta la compuerta por medio del C-linker, favoreciendo la apertura (tomado de Lee y MacKinnon, 2017).

## 5.2- Distribución

Los canales HCN están presentes ampliamente en especies de invertebrados y vertebrados. Estos canales se encuentran distribuidos tanto en tejidos excitables como en no excitables. A continuación, se mencionan algunos ejemplos de zonas, tejidos y células en los cuales se ha encontrado expresión de HCN, por ejemplo, se ha encontrado expresión de HCN1 en neuronas periféricas y centrales (hipocampo, cerebelo, neocorteza,

ganglios de la raíz dorsal, células gustativas, fotorreceptores), nódulo sinoauricular, células  $\beta$ -pancreáticas, nódulo sinoauricular y ovario. El HCN2 por otro lado se sabe que se expresa ampliamente en neuronas periféricas y centrales, células  $\beta$ -pancreáticas, ovario, nódulo sinoauricular y en médula interna del riñón. El HCN3 se expresa a la baja en el sistema nervioso central, también se puede encontrar en retina (células bipolares), bulbo olfatorio,  $\beta$ -pancreáticas y ovario. Finalmente, el HCN4 con bajos niveles de expresión en tálamo, retina (células bipolares), bulbo olfatorio, células gustativas, testículos,  $\beta$ -pancreáticas y ovario, pero con una enorme densidad en el nódulo sinoauricular a diferencia de HCN1-3 (Saldaña-Meyer, 2009 y Biel et al., 2009). Sin embargo, aún se desconoce la relevancia funcional de los HCN en algunas de estas células y tejidos debido a los bajos niveles de expresión que presentan.

### **5.3- Relevancia funcional**

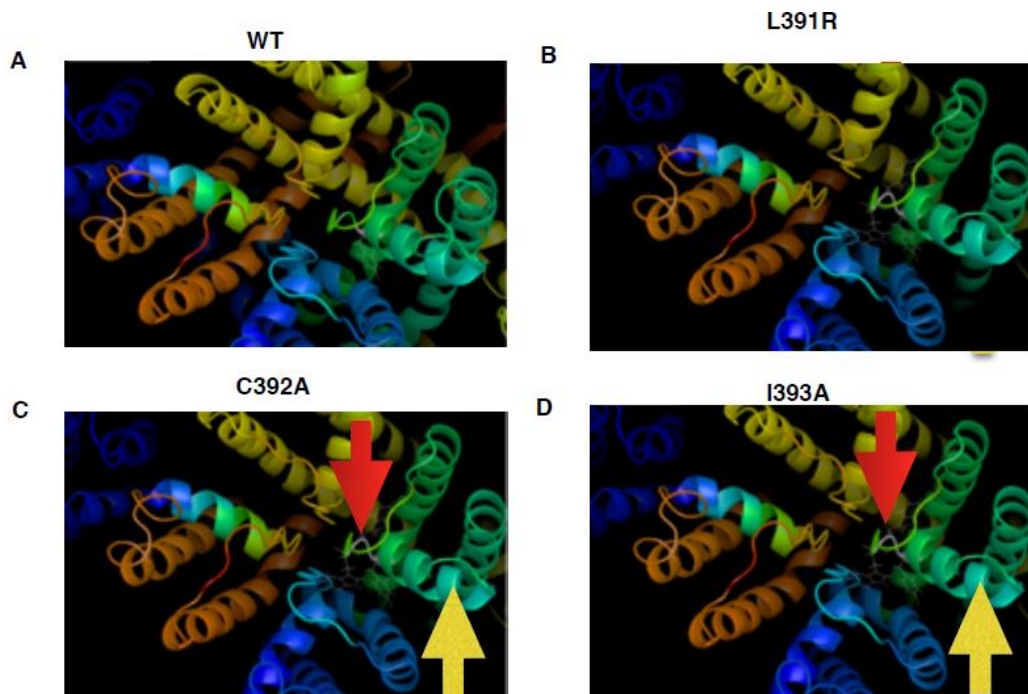
Los canales HCN contribuyen de varias formas en la ritmicidad de las células del nodo sinoauricular del corazón y las neuronas en el sistema nervioso central, dentro de esta última son responsables de varias funciones importantes, como la excitabilidad, la generación y la modulación de la actividad rítmica, la integración dendrítica y la transmisión de potenciales sinápticos (DiFrancesco, 2015). La acción de los HCN sobre la excitabilidad neuronal surge de cuatro propiedades fundamentales: 1) permeabilidad para  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ; 2) curva de activación en potenciales cercanos al umbral de disparo; 3) potencial de inversión de -20 a -30 mV; 4) cinética de activación lenta. Debido a estas características, los canales generan una corriente de despolarización capaz de mover el potencial de membrana hacia un umbral de disparo. Un potencial de membrana en reposo promedio ronda los -65 mV, a este voltaje una fracción de canales de HCN está tónicamente abierto (Kase e Imoto, 2012 y Sartiani et al., 2017). Esto genera una entrada de  $\text{Na}^+$  que despolariza a la célula contrarrestando la hiperpolarización al oponerse a las perturbaciones de cargas negativas y positivas, por lo tanto, la corriente de los canales HCN estabiliza el potencial de membrana. Finalmente, una pérdida de la función de los

canales HCN causa hiperpolarización de la membrana y reducción de la excitabilidad intrínseca (Sartiani et al., 2017 y Spinelli et al., 2018). La creciente evidencia de modelos experimentales de enfermedades que están asociadas a mutaciones de HCN, sugieren la participación de canales disfuncionales. Se han descrito algunas mutaciones en estos genes y su relación patológica. Por ejemplo, en HCN4 se describió la mutación D553N que está asociada con un síndrome de arritmias cardiacas debido a alteraciones en la migración a la membrana celular. Esta mutación se detectó en 2004 en una familia japonesa y da lugar a bradicardias. Por otro lado, la mutación S672R de HCN4 afecta el sitio de unión de nucleótidos cíclicos y provoca bradicardia sinusal. Otra mutación como G480R del mismo canal está asociada con bradicardia asintomática, esta mutación afecta el arreglo GYG que forma el filtro de selectividad (Postea et al., 2011).

Además, la remoción experimental del HCN2 genera crisis epilépticas en ratones knock-out (Ludwig, 2003). Asimismo, la reducción y abolición de la expresión de HCN1 provoca convulsiones, resultado de un aumento de la excitabilidad neuronal (Kole et al., 2007 y Walker et al., 2009). Los canales HCN también se expresan ampliamente en el sistema nervioso periférico y la evidencia reciente ha destacado la importancia de la isoforma de HCN2 en la transmisión del dolor; por ejemplo, en modelos de ratón se ha tratado de estudiar el vínculo entre el HCN2 y el dolor asociado a neuropatías diabéticas, bloqueando o eliminando la expresión del canal, donde se observó una disminución de la activación de neuronas de segundo orden en la medula espinal; además, al incrementar la concentración de cAMP promueven la actividad de fibras nociceptivas, por lo tanto, los HCN pueden ser importantes blancos terapéuticos (Tsantoulas et al., 2017). Por tal motivo es importante tratar de entender el nexo entre la estructura/función de los canales HCN.

En nuestro laboratorio se realizó la caracterización funcional de mutantes puntuales de la secuencia 391LCI393 del canal HCN2 de *X. tropicalis*, además de estudios de modelamiento *in-silico* que mostraron un cambio en la estructura de la proteína, en la región del poro y una ruptura de una hélice alfa en el C-linker (Villafuerte, tesis de maestría, 2016) (Figura 8). Posteriormente la expresión funcional de los canales mutantes en ovocitos de rana *X. laevis*, mostraron cambios en las cinéticas de activación y desactivación de las corrientes. Debido a las observaciones en los canales mutados se

propone al C-linker como una bisagra de la compuerta, en relación con el efecto de los residuos LCI sobre el C-linker, ya que pueden alterar la capacidad de esta estructura de regular el mecanismo de apertura y cierre del canal. Por lo tanto, se propone que la secuencia LCI está involucrada en procesos de regulación de la función de la compuerta del HCN2 (Villafuerte Ojeda, M. 2016), por consiguiente, en este trabajo se trató de describir los cambios provocados al mutar en un solo paso los tres residuos LCI.



**Figura 8. Estructura *in silico* del HCN2Wt y mutantes puntuales de la región LCI. A)** Se muestra la estructura del poro del canal HCN2Wt en una vista inferior. **B, C, D)** Se muestran los HCN2 mutados en la región LCI en una vista inferior sobre la región del poro, la flecha roja indica el lugar de la mutación y la flecha amarilla señala una ruptura de la hélice en el C-linker (Villafuerte Ojeda, tesis de maestría. 2016).

## **6- Hipótesis**

La secuencia de aminoácidos LCI adyacente al filtro de selectividad es determinante para mantener las propiedades electrofisiológicas del canal, de tal manera que la triple mutación de dichos aminoácidos del canal iónico HCN2 influirá sobre la función del canal.

## **7- Objetivos**

### **7.1- Objetivo general**

Determinar las características electrofisiológicas de una triple mutación de la secuencia LCI adyacente al filtro de selectividad del canal HCN2.

### **7.2- Objetivos específicos**

- Generar una triple mutación de la región 391LCI393 a 391AAA393 en el canal HCN2.
- Determinar las propiedades funcionales del canal HCN2 mutado en la secuencia LCI.
- Mediante sustitución iónica, explorar cambios en la selectividad del canal mutado.

## **8- Justificación**

La importante función que ejercen los canales HCN en la regulación del ritmo cardiaco, así como el control de la excitabilidad neuronal en el sistema nervioso central, los convierte en interesantes objetivos de estudio. Estas funciones se ven afectadas por mutaciones en la estructura de los canales modificando su actividad, dichas alteraciones están involucradas en la generación de arritmias cardiacas o epilepsias por mencionar algunos ejemplos.

Por lo tanto, la importancia de esta investigación es determinar la relevancia de una secuencia de tres aminoácidos altamente conservados (LCI) de los canales HCN cuya función aún es desconocida.



## 9- Metodología

### 9.1- Generación de mutantes

Para generar la triple mutación de la región LCI del poro se utilizó un protocolo de mutagénesis sitio dirigida con oligonucleótidos previamente diseñados, estos corresponden a un fragmento de 36 bases del gen HCN2 de *X. tropicalis*. Por medio de sustitución de bases se generó una triple mutación en los residuos 391LCI393 por 391AAA393.

	391	392	393
Silvestre	L	C	I
Mutante	A	A	A

**Tabla 1. Secuencia de aminoácidos.** Se generó una triple mutación en la región del poro siguiendo la secuencia de aminoácidos que se muestra en la figura.

Tomando como molde el DNAC de HCN2 con la mutante puntual I393A clonada en pGEMT-Easy-HCN2 (Villafuerte, tesis de maestría, 2016), se diseñaron los oligonucleótidos para el protocolo de mutagénesis sitio dirigida (forward 5'gccatgagccacatgGCgGCTgccggctatgggcg 3') por medio de PCR. Los reactivos y las condiciones del PCR se muestran en las siguientes tablas.

<b>Reactivo</b>	<b>(<math>\mu</math>l)</b>
H2O MQ	15.5
Buffer 10X	2.5
dNTP's 10 mM	1
Oligo F 2.5 $\mu$ M	4.5 (125ng)
Oligo R 2.5 $\mu$ M	4.5 (125ng)
DNA 1 ng/ $\mu$ l	2
Enzima (Pfu) 1 U/ $\mu$ l	1
Volumen final	25

**Tabla 2. Reactivos para protocolo de mutagénesis.** Se muestran los reactivos utilizados para generar la mutación utilizando un protocolo de mutagénesis sitio dirigida por PCR

<b>Temperatura/Tiempo</b>	<b>No. de Ciclos</b>
95 °C / 30 seg	1
95 °C / 30 seg	
55 °C / 1 min	18
72 °C / 9 min	
68 °C / 10 min	1

**Tabla 3. Condiciones de PCR.** Se muestra la temperatura, el tiempo y el número de ciclos para llevar a cabo el PCR.

## 9.2- Transformación en bacterias competentes

Se emplearon bacterias competentes *E. coli XL1-Blue* que provee la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología, las cuales se encontraban en ultracongelación y posteriormente se trasladaron a hielo por 3 min, para descongelarse. A

continuación, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de las bacterias y se colocaron en un tubo nuevo y estéril de 1.5 ml dónde se agregó 10  $\mu\text{L}$  del producto de PCR. Subsiguiente a esto se incubó la mezcla en hielo durante 30 min para inducir un choque térmico, el cual consistió en someter la preparación a una temperatura de 42°C durante 90 segundos e inmediatamente finalizado el tiempo se cambió el tubo a hielo por 2 min, posteriormente se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de medio SOC (2% triptona, 0.5%, 10 mM NaCl, 2.5 Mm KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgSO}_4$  y 20 mM glucosa) y se mantuvo en agitación constante a 200 rpm, 37°C durante 1 h. En seguida se sembraron 200  $\mu\text{L}$  de células transformadas en cajas Petri preparadas con medio LB y ampicilina (0.1 mg/ml). Se incubaron las cajas a 37°C durante 16 h, posteriormente se seleccionaron colonias aisladas para propagarlas en 6 ml de medio líquido LB con ampicilina (0.1 mg/ml) y se mantuvieron en agitación a 200 rpm, 37°C durante 12 h, se utilizó el mismo protocolo para propagar el HCN2Wt.

### **9.2.1- Extracción de plásmido**

Se colectaron 1.5 ml del medio líquido que presento turbidez, indicativo del crecimiento bacteriano y se centrifugaron a 12,000 rpm por 4 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y cuidadosamente se retiró por completo el medio hasta conservar solo el pellet de células dentro del tubo, subsiguiente se resuspendieron las células en 200  $\mu\text{L}$  de solución I fría (50 nM glucosa, 25 nM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA, pH 8), se agitó vigorosamente en vórtex por 2 min, después se adicionó al tubo 200  $\mu\text{L}$  de solución II a temperatura ambiente (0.2 N NaOH, 1% SDS) y se mezcló suavemente invirtiendo el tubo 10 veces, se incubó a 4°C por 5 min, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de solución III fría (5 M acetato de potasio, ácido acético glacial), se mezcló sutilmente invirtiendo el tubo de 6 a 10 veces y se incubó a 4°C por 15 min.

A continuación, se centrifugó el tubo a 12,000 rpm, 4°C por 15 min, al finalizar se formaron dos fases, una con un sedimento blanco compuesto de los agregados macromoleculares y otra fase acuosa que contiene el DNA plasmídico, se procedió a retirar la fase acuosa evitando el sedimento y se colocó en un tubo nuevo estéril al cuál se le agregó 1 ml de isopropanol a 4 °C y se mezcló suavemente 10 veces, se incubó el tubo a 4°C por 15 min.

Al finalizar el tiempo se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 15 min y se retiró el sobrenadante.

Se agregaron 900 µL de etanol al 70% a 4°C, se mezcló suavemente 10 veces y se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 10 min, se retiró el sobrenadante, posteriormente se secó en servilleta estéril colocando el tubo de manera invertida dentro de una incubadora a 37°C por 5 min para eliminar el etanol restante, finalmente se disolvió la pastilla en 50 µL de agua MiliQ libre de DNAasa y se almacenó a -30°C.

### **9.3- Transcripción *in vitro* de mRNA**

Se linealizó el plásmido molde utilizando la enzima de restricción BamH1. Se incubó la reacción a 37°C durante una noche para la completa digestión del vector y se corroboró su calidad en un gel de agarosa al 0.7%. A continuación, se colocaron 8 µL de la reacción anterior en un tubo nuevo al cual se le adicionó 250 µL de fenol y cloroformo respectivamente, después se llevó la mezcla a un volumen final de 1000 µL con agua MiliQ. Subsiguiente a este paso se mezcló en vórtex un par de segundos para homogenizar, y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C, después se retiró la fase orgánica colocándola en un tubo nuevo al cual se le agregaron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M con 0.8 volúmenes de isopropanol frío, se incubó a -20°C por 15 min, se centrifugó por 15 min a 13,000 rpm a 4°C, al término se retiró el sobrenadante evitando la pérdida del pellet formado en la parte inferior del tubo, se centrifugó y se removió el residual, se colocaron 500 µL de etanol frío al 70 % libre de RNasas después se agitó suavemente varias veces invirtiendo el tubo, se centrifugó y retiró el sobrenadante, se secó en servilleta estéril en posición invertida hasta evaporar el restante. Se disolvió la pastilla en 50 µL de agua libre de RNasas. Finalmente, para la síntesis de mRNA se utilizó el kit de Invitrogen Ambion mMESSAGING mMACHINE T7 Transcription para a la síntesis del mRNA. Se incubó la reacción por 2 h a 37°C en un tubo estéril, al finalizar se agregó 1 µL de TURBO DNasa, se agitó la mezcla para homogenizar y se incubó durante 15 min a la misma temperatura. Posteriormente se colocaron 30 µL de agua libre de RNasas y 30 µL de LiCl, y se mezcló suavemente, después se colocó el tubo a -20°C durante 8 h. A continuación, se centrifugó el tubo a 4°C por 15 min a 13,000 rpm, se removió el

sobrenadante y se lavó el pellet con 300  $\mu\text{L}$  de etanol frío al 70 %, libre de RNasas, se centrifugó y removió el etanol, finalmente se disolvió el mRNA en agua libre de RNasas y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **9.4- Obtención y microinyección de ovocitos**

Se seleccionaron ranas hembras *X. laevis* a las cuales se les realizó una cirugía abdominal, previamente anestesiadas colocándolas en hielo durante 30 min, utilizando fórceps del número 5 se extrajeron varios lóbulos del ovario, y folículos individuales fueron aislados del lóbulo los cuales se colocaron en solución de Barth (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.33 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.41 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.82 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5 mM HEPES y 0.1 mg/mL de gentamicina, pH 7.4.), posteriormente a los folículos les fueron retiradas las capas celulares y acelulares más superficiales..

A continuación, los ovocitos fueron tratados con colagenasa al 0.3% en solución de Ringer sin  $\text{Ca}^{2+}$  (15 mM NaCl, 2 mM KCl, 5mM HEPES y pH 7.4) durante 30 min para retirar remanentes de la capa folicular. Al término del tratamiento se lavaron con solución de Ringer sin  $\text{Ca}^{2+}$  5 veces y con solución Barth 3 veces, se colocaron en solución de Barth y se incubaron a  $18^{\circ}\text{C}$  durante una noche. Para la microinyección se utilizó una cantidad aproximada de 100 nL de mRNA por ovocito a una concentración  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  con ayuda de un microinyector (Nano liter 2000), y finalmente se colocaron en 10 ml de solución de Barth a  $18^{\circ}\text{C}$ .

#### **9.5- Registro electrofisiológico**

Los registros electrofisiológicos de las células se realizaron utilizando la técnica de control de voltaje con dos microelectrodos, de 48 a 96 h posterior a la microinyección. Los electrodos de registro utilizados se obtuvieron a partir de capilares de borosilicato utilizando un estirador de pipetas PUL-100 (microprocessor-controlled, vertical pipette puller) y se llenaron con una solución 3 M de KCl, con una resistencia final de 2-3 M $\Omega$ .

Se utilizaron diferentes soluciones de Ringer modificadas a partir de la solución normal de Ringer (115 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, ajustando el pH a 7.4) para los experimentos de sustitución iónica. Estas consistieron en sustituciones equimolares de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, como sigue: una solución (en mM) 97 KCl:20 NaCl, otra 97 NaCl:20 KCl, mientras que en dos soluciones más fue sustituido el NaCl por 97 mM de LiCl o por 97 mM NMDG<sup>+</sup>, estas últimas dos soluciones contenían la misma concentración de KCl (20 Mm) (Tabla 4).

Las corrientes generadas se registraron en presencia de cada una de las soluciones a temperatura ambiente (22-25°C), las cuales se perfundieron en la cámara de registro por gravedad, para activar el canal se diseñaron dos protocolos: el primero consistió en fijar el ovocito a -40 mV y aplicar una serie de pulsos en pasos de -10 mV hasta -140 mV, después de cada paso se aplicó un pulso a -140 mV para obtener las corrientes de cola, a este protocolo se le nombro de activación. Posteriormente se diseñó el protocolo de desactivación donde nuevamente fijamos el ovocito a -40 mV y se continuó a aplicar un prepulso a -140 mV posteriormente le siguió una serie de pulsos de +20 a -140 mV en pasos de -10 mV. Los datos de los registros se adquirieron utilizando un amplificador y fueron almacenados digitalmente utilizando un convertidor AD y el software pClamp 10.5.

1	97 mM K <sup>+</sup>	20 mM Na <sup>+</sup>	2	97 mM Na <sup>+</sup>	20 mM K <sup>+</sup>
			3	97 mM Li <sup>+</sup>	20 mM K <sup>+</sup>
			4	97 mM NMDG <sup>+</sup>	20 mM K <sup>+</sup>

**Tabla 4. Soluciones para experimentos de sustitución iónica.** Se muestran las concentraciones de los iones utilizados para evaluar el comportamiento del canal. Se utilizaron soluciones de Ringer (pH 7.4, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM y HEPES 5 mM), modificando las concentraciones de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> y sustituyendo al Na<sup>+</sup> por Li<sup>+</sup> y NMDG<sup>+</sup> de manera equimolar.

## 9.6- Análisis de relación I-V

La corriente máxima se determinó a partir del pico de la corriente de cola a -140 mV utilizando el protocolo de activación. Se normalizó la corriente  $I/I_{MAX}$ , posteriormente se ajustó a la curva a una función de Boltzmann, para determinar el  $V_{1/2}$ , así como el umbral de activación. Por otro lado, empleando el protocolo de desactivación se pudo determinar el potencial de inversión utilizando las colas de corriente obtenidas después del pulso hiperpolarizante a -140 mV, midiendo en el pico de la amplitud máxima obtenida.

Para determinar el tiempo de apertura se utilizó el primer trazo de cola de corriente en el protocolo de activación y posteriormente el cierre utilizando el primer trazo de cola de corriente generada después del pulso hiperpolarizante con el protocolo de desactivación. De esta manera se precisó el tiempo constante de activación ajustando a una función exponencial para definir su componente rápido.

$$f(t)=Aie^{(-t/\tau)} + C$$

Donde t es el tiempo,  $\tau$  representa una constante rápida de activación,  $A_i$  son fracciones del componente y C es un componente constante.

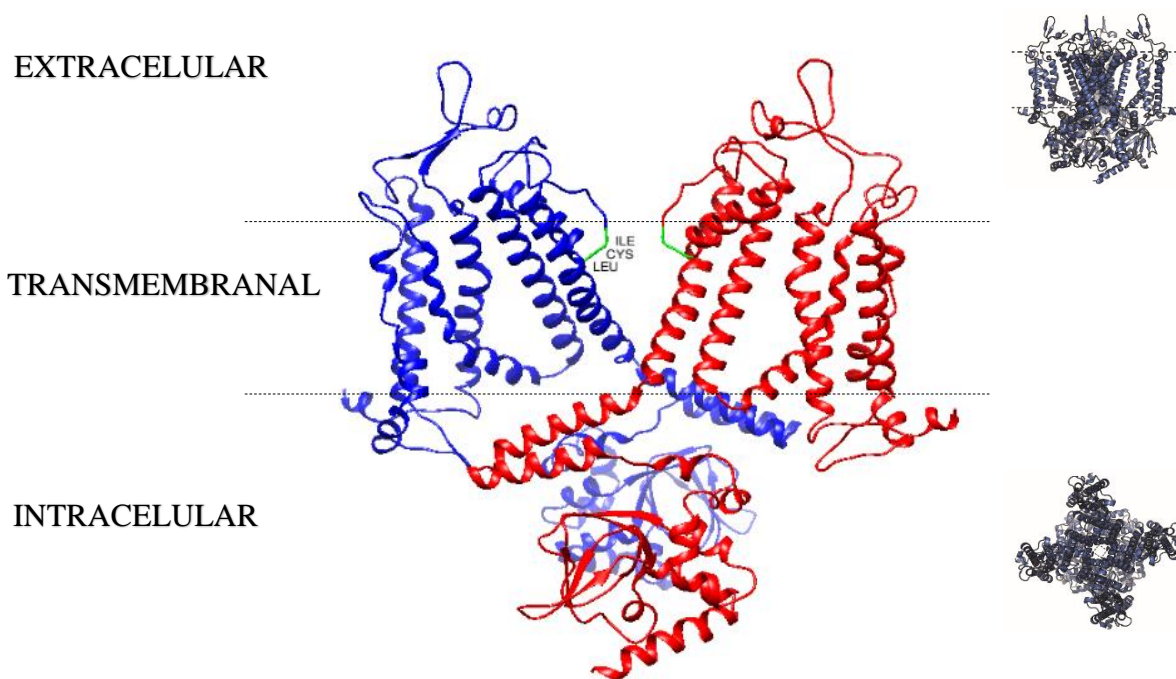
## 9.7- Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó utilizando el software Clampfit 10.3 y la herramienta estadística GraphPad. Se analizó la significancia estadística entre más de dos grupos mediante un ANOVA de una vía y de dos vías cuando se comparó el voltaje aplicado con la solución, así como una t seguido de una prueba de Tukey (post-hoc). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos señalados con un asterisco (\*).

## 10. Resultados

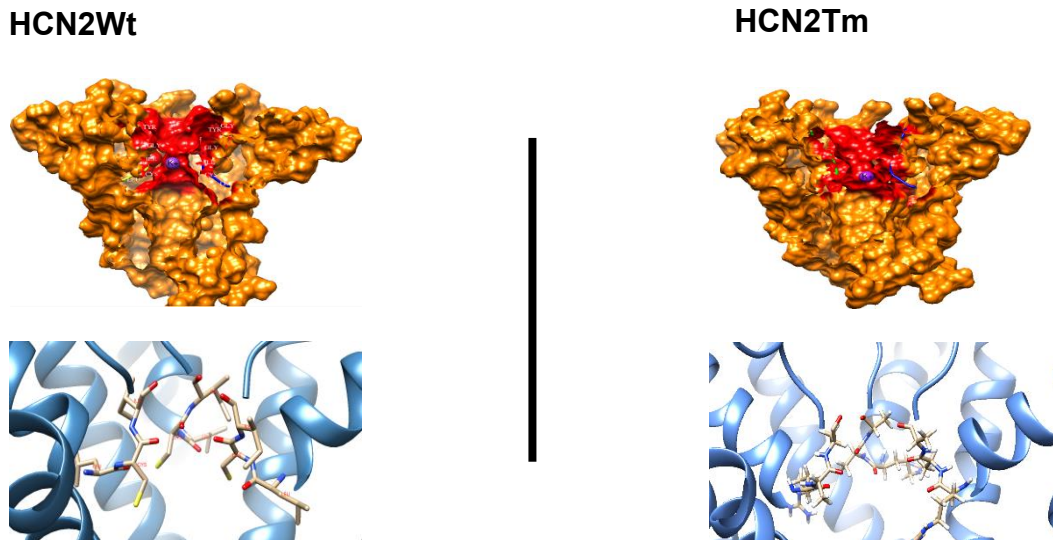
### 10.1- Modelado *in silico* del HCN2 de *X. tropicalis*.

Se realizó un modelado *in-silico* del canal HCN2 de *X. tropicalis* (Figura 9) basado en el modelo de HCN1 humano cristalizado (Lee y MacKinnon, 2017). Este modelamiento nos permitió obtener una aproximación del efecto que puede generar la triple mutación sobre la estructura de la región del poro. En la Figura 10 en el HCN2Wt se puede observar como los átomos de oxígeno de los aminoácidos (LCIG) se orientan hacia el vestíbulo del poro sugiriendo posibles sitios de interacción para  $K^+$  de acuerdo con Lee y MacKinnon (2017), pero son los residuos 393I y 394G los involucrados en formar los sitios de unión, para corroborar lo mencionado anteriormente, en nuestra estructura se trató de determinar los posibles sitios de unión a  $K^+$ , utilizando los residuos 391LCIGYG396 se encontró



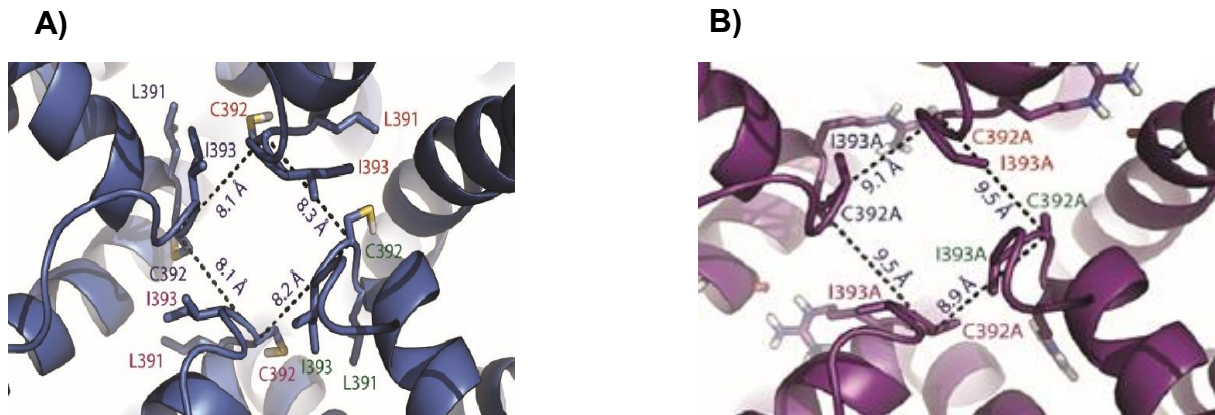
**Figura 9. Modelado *in silico* del HCN2 de *X. tropicalis*.** Se observan dos subunidades opuestas del homotetrámero HCN2Wt en listón (azul y rojo) dónde se ha resaltado con color verde la región de los residuos LCI localizados en el poro del canal. Además, se colocaron líneas punteadas que dividen la proteína para señalar hacia qué lado de la membrana se encuentran orientadas sus estructuras. Del lado derecho se muestran dos figuras del HCN2 en una vista lateral y superior del canal.





**Figura 10. Modelado in silico del HCN2Wt y Tm.** Puede observarse la estructura del poro mediante el diseño de una superficie molecular excluida de disolvente utilizando la hélice del poro hasta el S6 (naranja) y la superficie creada utilizando los residuos L/A C/A I/A G Y G (rojo) para el HCN2Wt y Tm respectivamente, utilizando el software UCSF Chimera y el paquete MSMS (Sanner et al., 1996). Las esferas purpuras representan los iones  $K^+$  situados en los posibles sitios de interacción dentro de la estructura, los cuales se colocaron en los lugares electroestáticamente favorables de acuerdo con la ley de Coulomb utilizando Chimera. En la parte inferior se muestra la región del poro resaltando los átomos de los residuos 391LCI393 y 391AAA393, en visualización con listón color azul se muestra la parte superior del S6 y parte del asa S5-S6 la cual forma la estructura del poro.

únicamente una interacción favorable para la unión de los iones localizada en los residuos 393I y 394G, cabe destacar que al hacerlo utilizando el canal mutado se encontró un resultado similar (I393A y 394G) (Figura 10), además para este canal se observa un incremento del tamaño del poro de aproximadamente 1.1 Å tomando como referencia a la distancia de los Ca del residuo 392 (Figura 11).



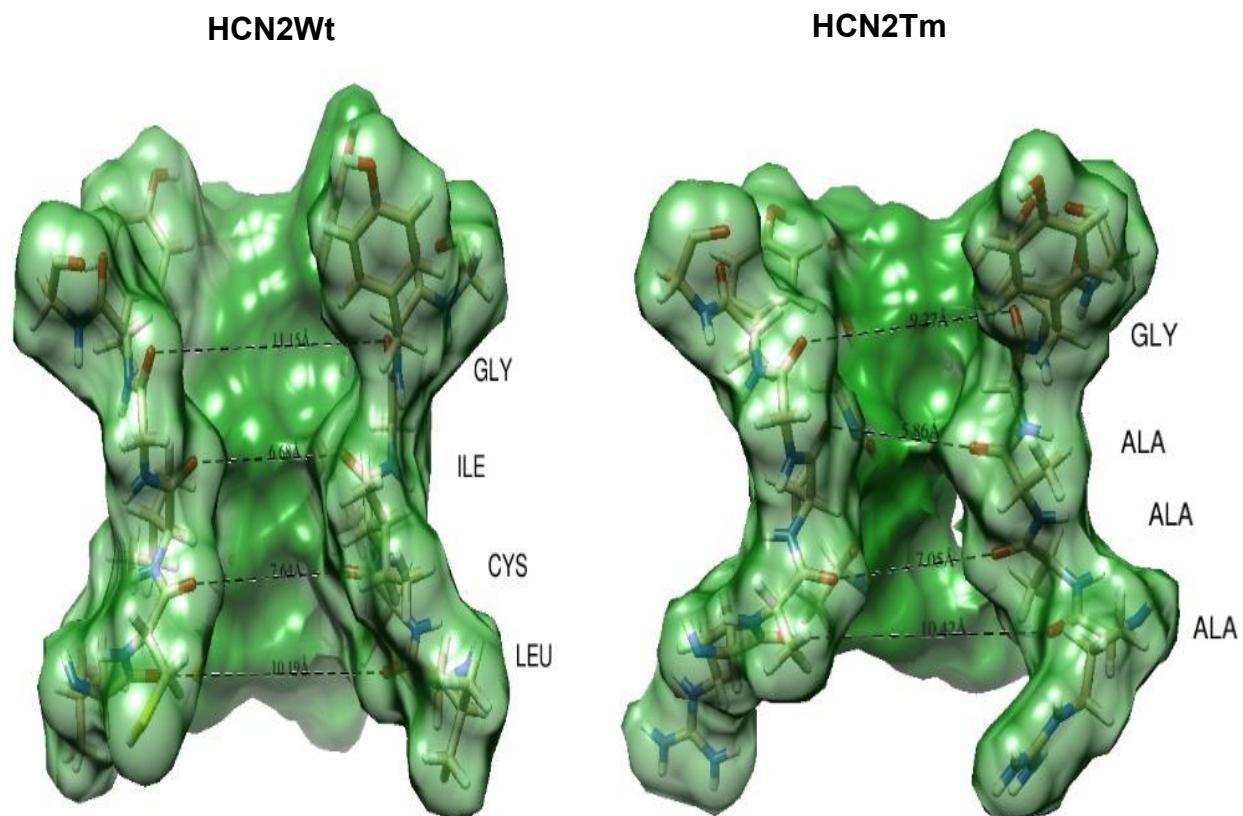
**Figura 11. Modelado *in silico* de la región del poro de HCN2. A)** Vista superior del HCN2Wt con un acercamiento en la región del poro, específicamente en la región del filtro de selectividad. **B)** Enfoque similar, pero en el canal mutado. Se calculó la distancia en ambos casos tomando como referencia los C $\alpha$  de los residuos C392 y A392 en el Wt y Tm respectivamente, encontrándose un aumento del tamaño promedio del poro de aproximadamente 1.1 Å.

Utilizando los átomos de oxígeno de los residuos 391-394 para calcular el radio promedio de interacción con los iones K<sup>+</sup> se encontró en el mutante una reducción en la distancia entre los oxígenos de los grupos carboxilo de los residuos C392A de 0.5 Å, I393A 0.4 Å y G394 de 1.4 Å, el radio promedio de interacción con los iones K<sup>+</sup> en el canal KcsA es  $\leq$  a 3.5 Å (Nimigeay y Allen, 2011) (Figura 12).

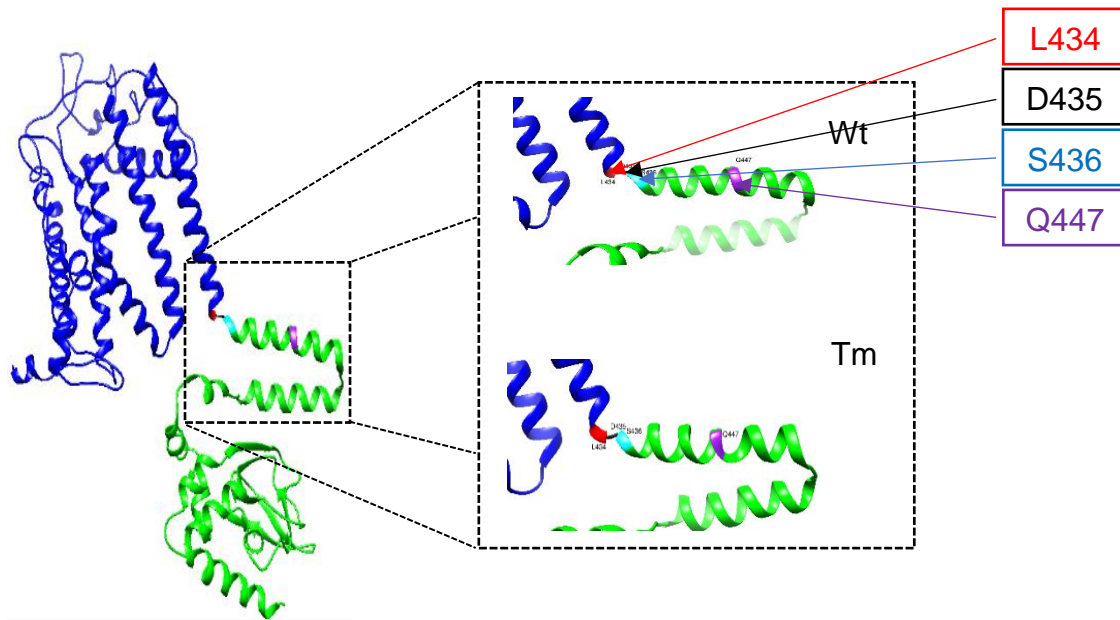
Anteriormente se mencionó sobre algunas observaciones que se hicieron en el laboratorio con las mutantes puntuales, sugiriendo que existe un cambio en el C-linker de una hélice  $\alpha$  (esta estructura funciona como la bisagra de la compuerta del canal), lo que induciría una modificación en la apertura. Utilizando estos nuevos modelos, se exploró dicha estructura y mediante un “*morphing*” se creó una trayectoria para definir de manera más

clara los cambios, observándose que efectivamente existe una modificación en uno de los giros en la hélice  $\alpha$  del C-linker específicamente en Q447, además del movimiento de L434 localizado hacia el N<sub>Term</sub> del S6, así como D435 y S436 en el C-linker hacia el C<sub>Term</sub> (Figura 13).

Decher (2004) considera que el residuo D443 (en el HCN2 de *X. tropicalis* este residuo se encuentra en la posición 435) del C-linker del HCN2 de ratón crea una interacción electrostática con R339 localizado en el S4-S5, sugiriendo que este puente salino estabiliza el estado cerrado participando en el acoplamiento del sensor de voltaje y la activación de la compuerta. Nuestro modelo sugiere la reorientación de la estructura del residuo D435, aún se desconoce si los residuos L434 y S436 tienen injerencia sobre el estado de la compuerta.



**Figura 12. Estructura del filtro de selectividad. A)** Se muestran los átomos acoplado con la representación con superficie (verde) de los aminoácidos 391LCIGYG396 y 391AAAGYG396. Para determinar la distancia promedio de interacción con los iones se utilizó como referencia a los átomos de oxígeno orientados hacia el vestíbulo de dos subunidades opuestas para medir la distancia entre esos átomos (calculado mediante Chimera). A continuación, se muestran los radios promedio; L391 (5.09 Å), C392 (3.82 Å), I393 (3.3 Å) y G394 (5.50 Å) para el HCN2Wt y para el HCN2Tm A391 (5.48 Å), A392 (3.31 Å), A393 (2.9 Å) y G394 (4.04 Å), Estos son los únicos residuos que orientan sus átomos de oxígeno de sus grupos carboxilos.

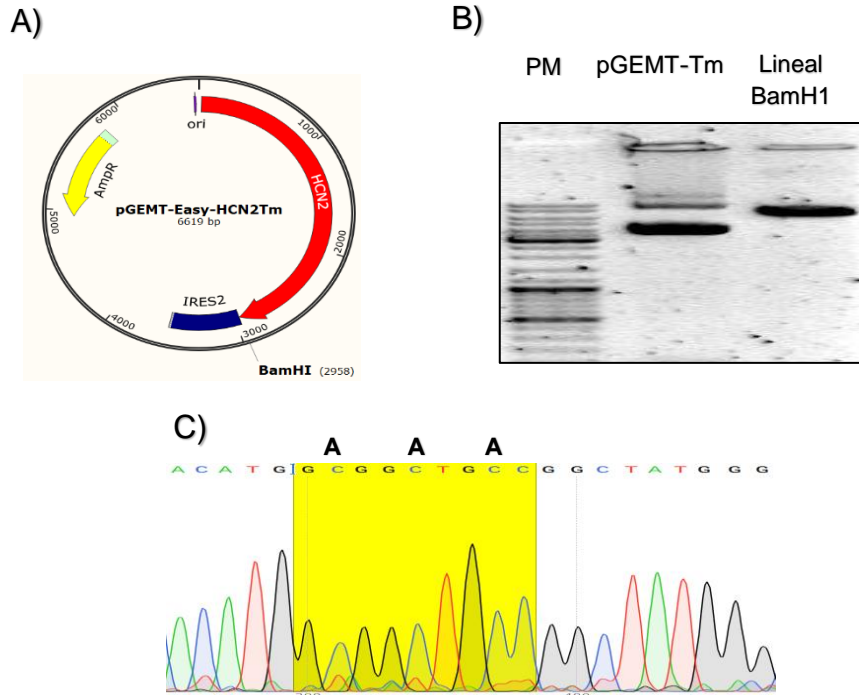


**Figura 13. Análisis de trayectoria.** Mediante una superposición y alineamiento de las estructuras *in silico* del HCN2Wt y Tm se hizo un morphing para determinar la trayectoria de una estructura a otra y definir los cambios en la región del C-linker. Se encontró una deformación en uno de los giros de la hélice  $\alpha$  (Q447) (púrpura), así como movimientos por parte de los residuos L434 (rojo), D435 (negro) y S436 (Cian), la región transmembranal y extracelular (S1-S6) se muestran color azul y la parte intracelular (C-linker y CNBD) se muestran en color verde.

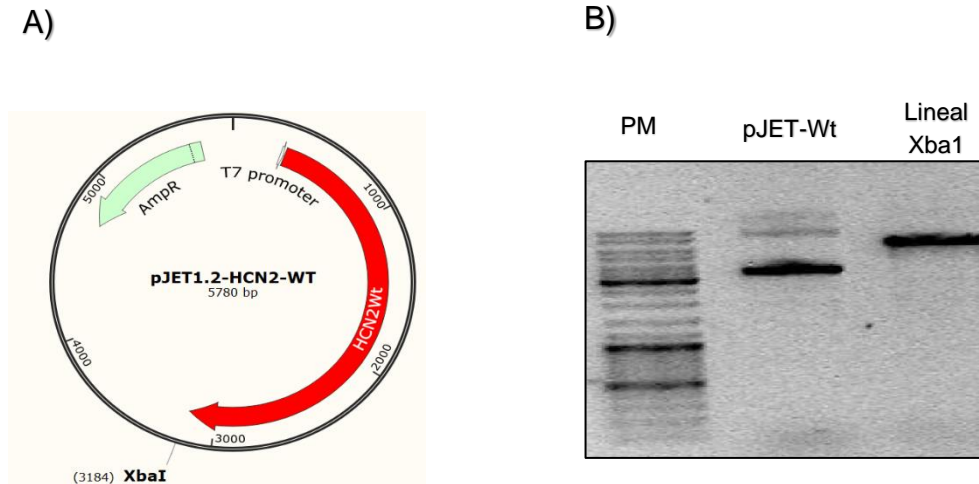
Se hizo el alineamiento de las estructuras HCN2Wt y Tm obteniéndose un valor RSMD= 0.713 Å. Se observó que la mayor cantidad de cambios en el canal se encuentran a partir del C-linker y la parte restante de la estructura hacia el C<sub>Ter</sub>m, eso quiere decir que el CNBD también se modifica, sin embargo, aún no se define concretamente si estos desplazamientos están directamente ligados a la mutación o si solo se trata de diferencias por problemas en el modelado de las subunidades del homotetrámero.

## **10.2- Generación del triple mutante y transcripción *in vitro* de HCN2Wt y HCN2Tm.**

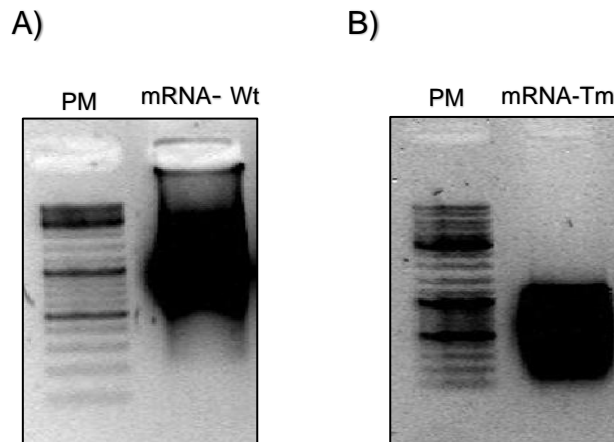
A partir del vector pGEMT-Easy-HCN2 con la mutación I393A (Villafuerte, tesis maestría, 2016) se generó la triple mutación 391AAA393, utilizando un protocolo de mutagénesis sitio dirigida. Se analizaron tres clonas independientes y se determinó su secuencia nucleotídica, en la Figura 14C se muestra el electroferograma donde se observa el cambio de los nucleótidos (se indica en amarillo la secuencia que se cambió y los aminoácidos para los cuales codifica cada triplete en los sitios 391-393). Posteriormente se utilizaron los vectores pJET-HCN2Wt y pGEMT-Easy-HCN2Tm para obtener los transcritos, en las figuras 14B y 15B se observa el mapa funcional y de restricción con la enzima que se utilizó para linealizar los vectores. Una vez verificando la calidad de los plásmidos linealizados se realizó con la síntesis del mRNA (Figura 16).



**Figura 14. Mapa funcional y de restricción del pGEMT-Easy-HCN2Tm. A)** Se muestra el mapa de restricción del pGEMT-Easy-HCN2Tm indicando el sitio de corte de la enzima BamH1. **B)** Digestión del plásmido dónde se observa el marcador de peso molecular (PM), el plásmido (pGEMT-Easy-HCN2Tm) y la banda del plásmido linealizado con BamH1 (Lineal BamH1). **C)** Electroferograma del HCN2Tm dónde se observa el cambio en la secuencia nucleotídica que codifica para la triple mutación de la región LCI.



**Figura 15. Mapa funcional y de restricción del pJET-HCN2Wt.** A) Se muestra el mapa de restricción del pJET-HCN2Wt indicando el lugar de corte de la enzima Xba1. B) Digestión del vector, se observa el marcador de peso molecular (PM), el plásmido (pJET-HCN2Wt) y la banda del plásmido linealizado con Xba1 (Lineal Xba1).

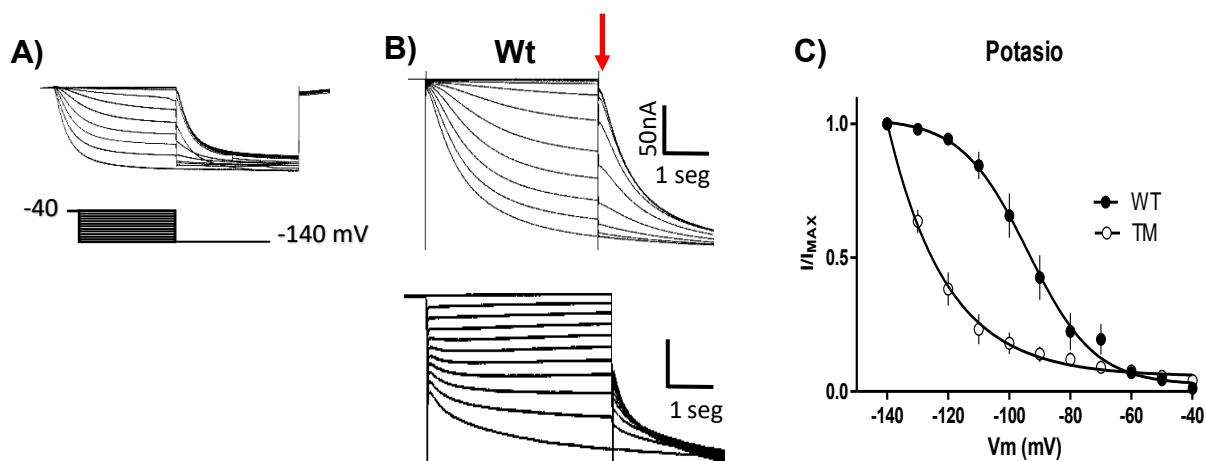


**Figura 16. mRNA obtenido a partir de la transcripción in vitro.** A) mRNA que codifica para el HCN2Wt. B) mRNA que codifica para el HCN2Tm.



### 10.3- Activación de las corrientes del canal HCN2Wt y Tm

Se diseñaron dos protocolos de activación basados en los descritos por Lee y Mackinnon, 2017; el primero para determinar tanto el umbral y el voltaje medio de activación utilizando una función de Boltzmann ( $V_{1/2}$ ), así como las taos de activación, el segundo se utilizó para determinar el potencial de inversión de la corriente y las tau de cierre. Los registros de corrientes obtenidos del HCN2Wt y Tm en la condición de alto  $K^+$  utilizando el protocolo de activación se muestran en la Figura 17B, se pueden observar cinéticas de activación y desactivación lentas características de los HCN2Wt, contrastante con lo observado con el HCN2Tm donde es claro el cambio en las cinéticas de corriente de activación, así como en sus colas de corriente.



**Figura 17. Corriente subyacente del canal HCN2Wt y Tm. A)** Trazo control utilizando Ringer normal. **B)** Trazos de corriente representativos obtenidos del HCN2 silvestre (Wt) y mutante (Tm) utilizando el protocolo de activación. Se utilizó un Ringer modificado donde se incrementó el potasio y se modificó el sodio de manera equimolar (97K-20Na). **C)** Se construyó la relación corriente-voltaje (derecha) midiendo la amplitud máxima en las colas de corriente (flecha roja). Se normalizó y se ajustó a una función de Boltzmann para obtener el  $V_{1/2}$ , para el HCN2Wt se calculó un  $V_{1/2} = -94.89 \pm 1.963$  mV y para el HCN2Tm  $V_{1/2} = -126.6 \pm 4.3$  mV.

de activación, así como el  $V_{1/2}$  (Figura 17C). Al observar el comportamiento de las curvas se detectó que se modificaba la dependencia de voltaje del canal ya que se mostraba una inflexión en la curva del HCN2Tm a partir de -90 mV sugiriéndose este valor como el umbral de activación, sin embargo, también muestra un pequeño porcentaje de corriente a potenciales menos negativos lo que probablemente puede sugerir un canal parcialmente abierto. A diferencia del HCN2Wt que tiene un umbral de activación entre -70 y -80 mV y alcanza su estado de saturación a partir de -120 mV, obteniendo un  $V_{1/2} = -94.89 \pm 1.963$  mV, 31.71 mV menos negativo que el  $V_{1/2}$  del Tm. Los trazos en concordancia con el gráfico sugieren que el HCN2Tm a diferencia del Wt permanece abierto y en estado conductivo después de -140 mV.

Posteriormente se utilizaron las soluciones de Ringer modificado para evaluar el comportamiento del canal. La primera fue constituida con 97K-20Na, la segunda se sustituyó el sodio con 97Li-20K y en la última solución se sustituyó el  $\text{Na}^+$  con NMDG<sup>+</sup> manteniendo la concentración de  $\text{K}^+$ , 97NMDG-20K, a estas soluciones a manera de síntesis en los gráficos se les nombro por el ion que tienen en mayor concentración  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y NMDG<sup>+</sup>, así como la solución de  $\text{K}^+$ , usada anteriormente.

En la Figura 18A, B, C se muestran los trazos representativos obtenido del HCN2Tm bajo las condiciones iónicas de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y NMDG<sup>+</sup>. Se observó que las cinéticas de activación de la corriente se modifican, y muestran una disminución en su amplitud. Además, se observan incrementos en las corrientes de fuga y peculiarmente el sistema no alcanza el estado de equilibrio al voltaje más hiperpolarizante (-140 mV) por lo tanto que el canal aún se mantiene en estado conductivo a estos voltajes muy negativos.

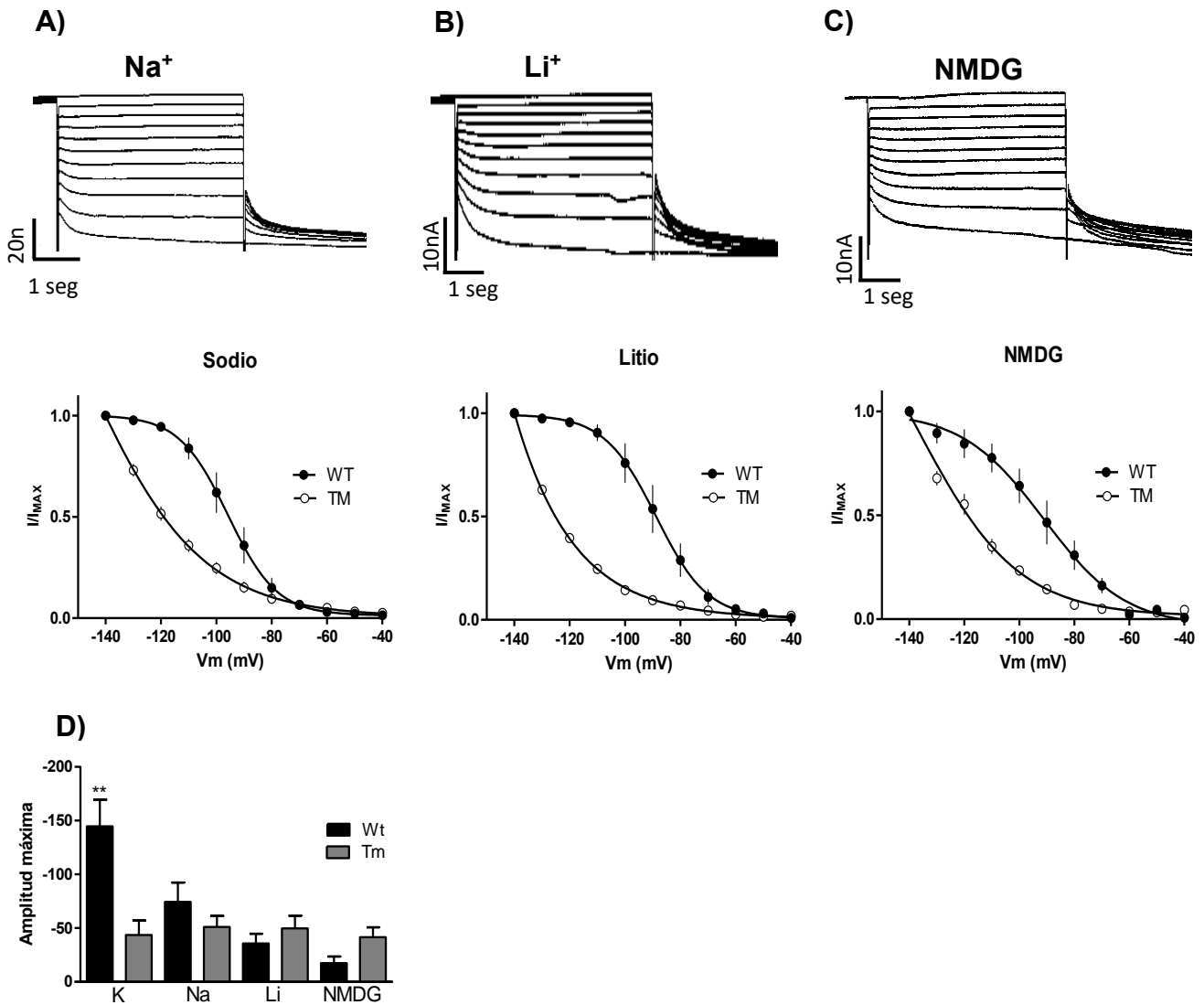
Sin embargo, para determinar concretamente si existen cambios en la activación del mutante y si impacta la sustitución del  $\text{Na}^+$  y la variación en la concentración de  $\text{K}^+$  en la activación, se normalizó la corriente y se ajustó a una función de Boltzmann para obtener el  $V_{1/2}$ . De esta manera se observó que no solo existen cambios en las cinéticas, también se observaron cambios en la dependencia a voltaje (Figura 18A, B, C).

El umbral de activación no se modifica en el HCN2Wt cuando se sustituye al  $\text{Na}^+$  en la solución o se incrementa el  $\text{K}^+$  ( $p > 0.05$ ), un fenómeno similar sucede con el mutante, al mismo tiempo se contrastaron los valores obtenidos del mutante con el silvestre mediante

un ANOVA de dos vías para definir si a un determinado potencial existen cambios en el flujo de la corriente, se encontraron diferencias significativas en los potenciales más hiperpolarizantes (-110 mV a -140 mV) ( $p < 0.05$ ).

Posteriormente se obtuvieron los  $V_{1/2}$  del HCN2Wt con las diferentes soluciones. Se encontró que en estas soluciones el  $V_{1/2}$  mostró un desplazamiento a potenciales negativos cuando se modifica la concentración de  $K^+$  y se sustituye al  $Na^+$  por NMDG<sup>+</sup>, aunque el  $V_{1/2}$  del  $Li^+$  es 12.46 mV menos negativo que el valor del  $Na^+$ , el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los  $V_{1/2}$  del silvestre ( $p > 0.05$ ) ( $Na^+ = -99.80 \pm 1.480$ ,  $Li^+ = -87.34 \pm 1.072$  y  $NMDG^+ = -104.6 \pm 1.505$  mV). Mientras que los  $V_{1/2}$  obtenidos para el mutante en las soluciones de  $Na^+$ ,  $Li^+$  y NMDG<sup>+</sup> fueron más negativos comparado con los  $V_{1/2}$  del HCN2Wt, con valores de  $-121.8 \pm 2.4$ ,  $125.6 \pm 1.5$  y  $125.10 \pm 3.9$  mV, respectivamente. Las pequeñas variaciones entre los  $V_{1/2}$  del HCN2Tm no arrojaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre sus valores, pero si son significativamente diferentes a los  $V_{1/2}$  obtenidos con el HCN2Wt ( $p < 0.05$ ).

En la Figura 18D se muestra cómo se incrementa la corriente con 97 mM de  $K^+$  en más de 94% respecto al  $Na^+$  (97 mM) en el HCN2Wt. Esto es debido a que el  $K^+$  tiene una gran influencia en la conductividad del canal (Maccaferri et al., 1982; Cerbai et al., 1993; Cerbai et al., 1994; Sartiani et al., 2017). No obstante, las corrientes con  $Li^+$  al parecer son mayores que las generadas con NMDG<sup>+</sup> donde se esperaría que el  $K^+$  sea el único ion permeable por el canal. Por lo tanto, el  $Li^+$  al parecer es capaz de permear a través del poro, pero con dificultad, ya que su amplitud de corriente es pequeña respecto a las generadas con  $K^+$  y  $Na^+$ . El efecto del  $K^+$  parece desaparecer en el HCN2Tm debido a que la amplitud máxima de la corriente obtenida con todas las soluciones son valores muy cercanos y no mostraron diferencias ( $p > 0.05$ ) ( $K^+ = -43.48$ ,  $Na^+ = -50.93$ ,  $Li^+ = -49.61$  y  $NMDG^+ = -41.44$  mV).

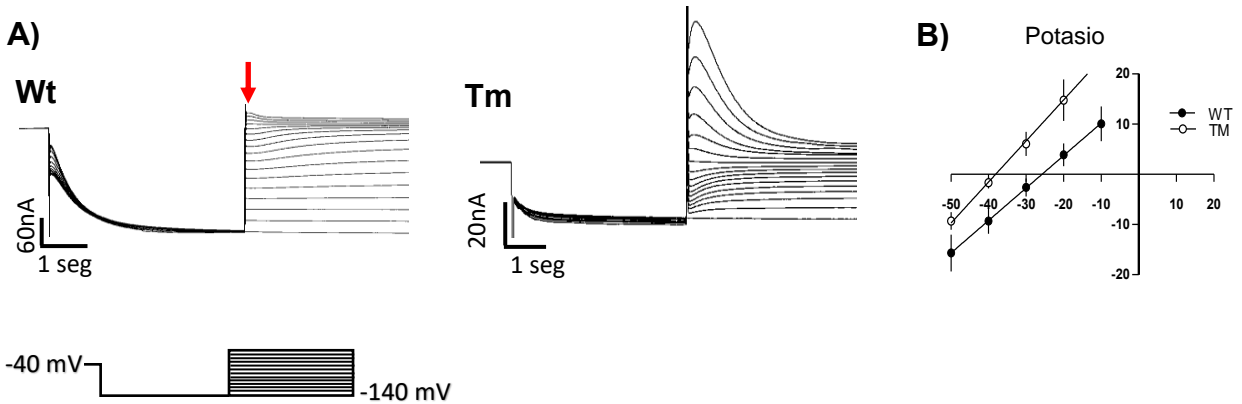


**Figura 28. Registros electrofisiológicos obtenidos con la sustitución iónica. A)** El primer Ringer modificado que se evaluó consistió en incrementar la concentración de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> de manera equimolar (97Na-20K). Los trazos de corriente obtenidos con el mutante se muestran en la primera figura de la izquierda y en su parte inferior la corriente normalizada contrastada con la obtenida del HCN2Wt en condiciones similares, ajustando a una función de Boltzmann para obtener el  $V_{1/2}$  del HCN2Wt=  $-99.80 \pm 1.480$  mV y HCN2Tm=  $-121.8 \pm 2.4$  mV. **B)** De la misma manera para el Li<sup>+</sup>, el cual se utilizó para sustituir al Na<sup>+</sup> (97Li-20K). En la parte central se muestran el trazo representativo y la

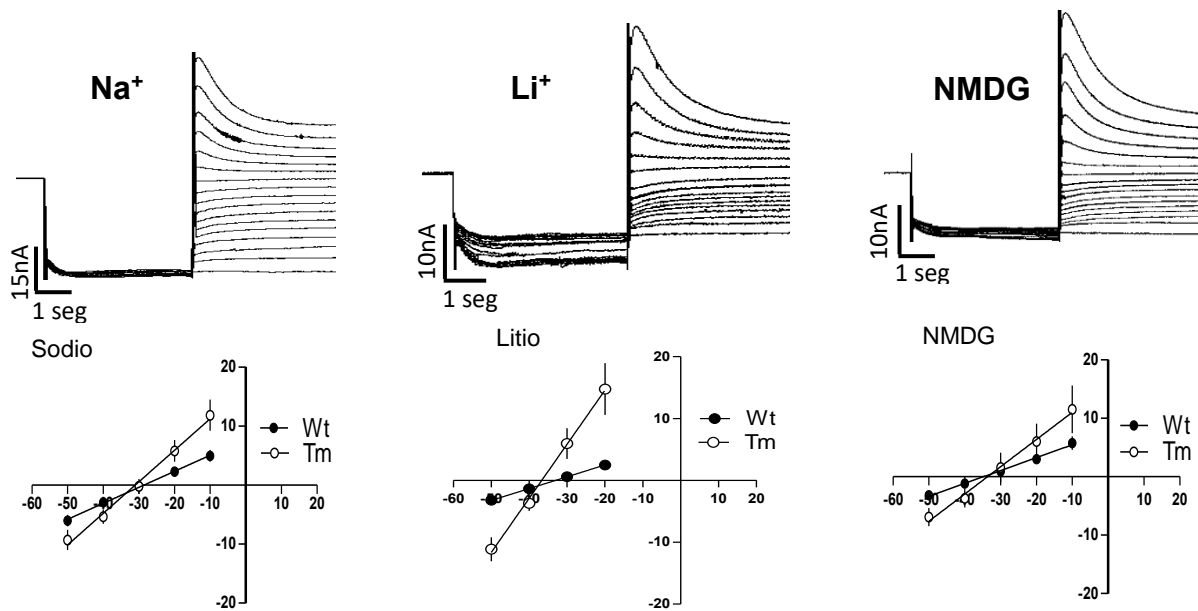
relación corriente voltaje, obteniéndose de esta manera un  $V_{1/2} = -87.34 \pm 1.072$  y  $-125.6 \pm 1.5$  mV para el HCN2Wt y Tm respectivamente. **C)** Y finalmente en la sustitución del  $\text{Na}^+$  por NMDG (97NMDG-20K) se obtuvo un  $V_{1/2} = -104.6 \pm 1.505$  mV para el silvestre y  $-125.10 \pm 3.9$  mV para el mutante (derecha). **D)** Amplitud máxima de la corriente obtenida del HCN2Wt y mutante bajo las diferentes condiciones iónicas, solo se encontraron diferencias significativas con el HCN2Wt cuando se utilizó la solución con 97K-20Na ( $p < 0.05$ ).

Para determinar si la mutación 391AAA393 del HCN2 impacta en la selectividad del canal, se utilizó un protocolo de desactivación para determinar el potencial de inversión de la corriente. Los trazos representativos de la corriente generada por el HCN2Wt y Tm se muestran en la Figura 19A utilizando la solución de alto  $\text{K}^+$ . Se puede observar en el canal mutante un incremento en la amplitud a potenciales despolarizantes y una disminución a voltajes negativos en las colas de corriente, efecto que fue opuesto a lo sucedido en el canal silvestre. En la Figura 19B se muestra la relación corriente-voltaje, donde se obtuvieron los valores  $-25.78$  y  $-38.13$  mV para HCN2Wt y Tm, respectivamente. Este desplazamiento del potencial de Inversión del canal mutante hacia potenciales más negativos sugiere un aumento en la permeabilidad a  $\text{K}^+$ .

En el HCN2Wt y solución 97K-20Na, el potencial de inversión se mantuvo negativo a  $-25.78$  mV, del mismo modo ocurrió con  $\text{Na}^+$  ( $-28.65$  mV), pero se desplazó hacia valores más negativos en  $\text{Li}^+$  ( $-33.05$  mV) o  $\text{NMDG}^+$  ( $-34.80$  mV) (Figura 20).

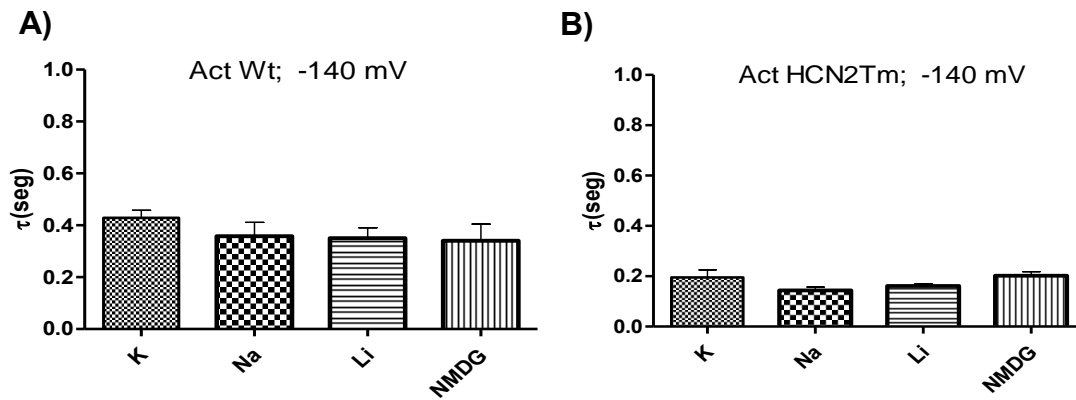


**Figura 19. Selectividad del canal en la triple mutación 391LCI393 > 391AAA393. A)** Se muestran los registros de corriente obtenidos del HCN2Wt y Tm de izquierda a derecha respectivamente, utilizando la solución con la máxima concentración de  $K^+$  (97K-20Na<sup>+</sup>) con la finalidad de mostrar de manera acentuada la corriente del HCN2Wt y Tm. Utilizando las colas de corriente resultantes del prepulso hiperpolarizante, midiendo en su amplitud máxima (flecha roja). **B)** Construyendo una relación corriente-voltaje para determinar desplazamientos en los potenciales de equilibrio y por ende cambios en la selectividad. Se obtuvo un valor para el HCN2Wt= -25.78 mV y el Tm= -38.13 mV, observándose un desplazamiento de -12.35 mV hacia voltajes más negativos en el mutante.



**Figura 20. Potencial de inversión y sustitución del Na<sup>+</sup>.** De izquierda a derecha en la primera figura se muestra la corriente en 97Na-20K de Tm y en la parte inferior respectiva se observa la relación I/V correspondiente, los valores del potencial de inversión para el HCN2Wt y Tm están indicados en el texto. También se muestran los resultados para las corrientes registradas en solución 97Li-20K y 97NMDG-20K respectivamente.

Como se sabe, las cinéticas de activación y desactivación de los canales HCN2 son lentas con  $t_{act}$  de  $346 \pm 24$  y  $462 \pm 23.5$  ms, respectivamente (Chen et al., 2001; Xue et al., 2002; Altomare et al., 2001; Much et al., 2003; Whitaker et al., 2007; Ye and Nerbonne, 2009; Sartiani et al., 2017), estos valores fueron muy parecidos a los obtenidos en el HCN2 de *X. tropicalis* (Figura 21A y 22A). Sin embargo, encontramos que el tiempo de apertura y cierre es afectado en el canal mutado. Por lo tanto, se midió el tiempo de activación y desactivación de la corriente y estimamos sus  $\tau$  ajustando sus cinéticas a una exponencial para medir el componente rápido.

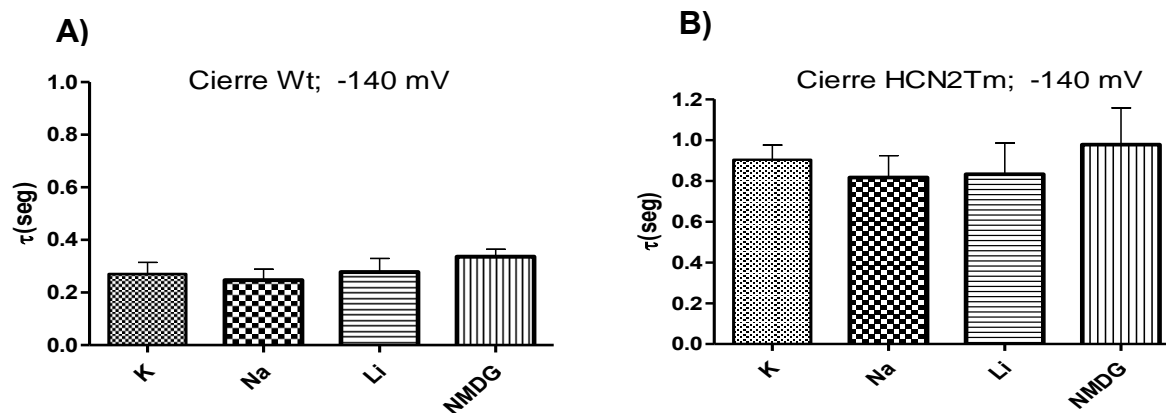


**Figura 21. Constante del tiempo de activación del HCN2Wt y Tm. A)** Utilizando una sola exponencial, medido a -140 mV se obtuvo el tiempo promedio de activación del HCN2Wt. **B)** En él HCN2Tm, medido a -140 mV puede observarse una disminución del tiempo de activación del canal respecto al HCN2Wt.

Con el protocolo de activación, se midió la tau en el pulso a -140 mV que partía del prepulso a -40 mV, de esta manera obtuvimos tiempo total de activación y posteriormente el cierre se midió utilizando las colas de corriente generadas con el protocolo de desactivación en el pulso a +20 mV que partía de un prepulso a -140 mV.

Se obtuvo el tiempo de activación para el HCN2Wt de;  $428.9 \pm 28.7$ ,  $357.7 \pm 53.2$ ,  $350.6 \pm 40.0$  y  $340.4 \pm 64.5$  ms, en soluciones de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> y NMDG<sup>+</sup> respectivamente (Figura 21A), estos valores no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). En cambio, el canal mutante mostró una disminución de sus taos de activación donde los resultados obtenidos fueron de  $195 \pm 29.44$ ,  $143.7 \pm 13.01$ ,  $161 \pm 7.59$  y  $202.3 \pm 15.97$  ms en K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> y NMDG, respectivamente (Figura 21B), las sustituciones por Na<sup>+</sup> e incrementos de K<sup>+</sup> en el HCNTm tampoco modificaron el tiempo de activación del canal ( $p > 0.05$ ) pero si es importante resalta la disminución del tiempo de activación..





**Figura 22. A) Constante del tiempo de cierre del HCN2Wt y Tm. A)** Constante del tiempo de cierre o desactivación del HCN2Wt, utilizando una sola exponencial y medido en el cierre a +20 mV después de aplicar el pulso hiperpolarizante a -140 mV. **B)** Tiempo promedio del cierre del HCN2Tm, utilizando una sola exponencial bajo las mismas condiciones del HCN2Wt. Puede observarse un incremento en el tiempo de cierre lo cual sugiere un canal abierto por más tiempo.

La tiempo de desactivación o cierre también fue afectado en la mutación en sentido inverso, es decir las taos incrementan, pasando en los HCN2Wt de:  $270.2 \pm 44.12$ ,  $247.3 \pm 41.59$ ,  $278 \pm 52.59$  y  $316.5 \pm 27.92$  ms, para K, Na, Li y NMDG<sup>+</sup>, respectivamente (Figura 22A), a valores en la mutante de:  $903.3 \pm 72.6$ ,  $816.2 \pm 1$ ,  $823.9 \pm 152.3$  y  $997.9 \pm 180$  ms, para las mismas condiciones iónicas (Figura 22B), por lo tanto la triple mutación modifica los estados de apertura y cierre del canal HCN2. En la Tabla 5 se muestra un resumen de los resultados obtenidos tanto para HCN2Wt como Tm.

	<b>K<sup>+</sup> Wt</b>	<b>Na<sup>+</sup> Wt</b>	<b>Li<sup>+</sup> Wt</b>	<b>NMDG<sup>+</sup> Wt</b>	<b>K<sup>+</sup> Tm</b>	<b>Na<sup>+</sup> Tm</b>	<b>Li<sup>+</sup> Tm</b>	<b>NMDG Tm</b>
<b>V<sub>1/2</sub></b> <b>(mV)</b>	-94.89 ± 1.963	-99.80 ± 1.480	-87.34 ± 1.072	-104.6 ± 1.505	-126.6 ± 4.3	-121.8 ± 2.4	-125.6 ± 1.5	-125.1 ± 3.9
<b>E<sub>inv</sub></b> <b>(mV)</b>	-25.78	-28.65	-33.05	- 33.65	-38.13	-32.06	-38.50	-34.80
<b>I<sub>max</sub></b> <b>(nA)</b>	-144.52	-74.24	-35.58	-17.22	-43.48	-50.93	-49.61	-41.44
	(n=11)	(n= 9)	(n=9)	(n=8)	(n=7)	(n=6)	(n=9)	(n=6)
<b>t<sub>act</sub></b> <b>(seg)</b>	0.428	0.357	0.350	0.340	0.195	0.143	0.161	0.202
<b>t<sub>desact</sub></b> <b>(seg)</b>	0.270	0.247	0.277	0.336	0.903	0.816	0.832	0.977

**Tabla 5. Resumen de datos obtenidos con el HCN2Wt y Tm.** En la tabla se muestra el valor V<sub>1/2</sub>, E<sub>inv</sub> (potencial de inversión de la corriente), I<sub>max</sub> (la amplitud máxima de la corriente), t (tau de activación y desactivación o cierre) para cada condición iónica estudiada en el canal HCN2Wt y HCN2Tm.

## 11- Discusión

La corriente hiperpolarizante que subyace a los canales HCN, posee inusuales características responsables de importantes funciones debido a que genera un proceso de despolarización después de una repolarización en un potencial de acción. Los defectos genéticos y la expresión alterada de los canales HCN están vinculados a varias patologías, lo que hace de estas proteínas objetivos importantes de investigación. Sin embargo, la relación estructura-función de los canales HCN permanece incierta debido a la escasa evidencia experimental en cuanto a la función de sus residuos aminoacídicos.

En el presente estudio en un intento por caracterizar la función de los residuos L391, C392, I393 localizados en la región del poro de canal HCN2 de *X. tropicalis* y que debido a su posición pueden estar involucrados en la permeabilidad a Na<sup>+</sup> ya que son diferentes a los encontrados en los filtros de selectividad en canales de K<sup>+</sup> como se puede observar en el siguiente cuadro.

			↓↓↓		
HCN1	336	ALFKAMSHM	<b>LCI</b>	GYGQQA	354
HCN2 <sub>Xenopus</sub>	382	ALFKAMSHM	<b>LCI</b>	GYGRQA	399
HCN3	299	ALFKAMSHM	<b>LCI</b>	GYGQQA	317
HCN4	464	ALFKAMSHM	<b>LCI</b>	GYGRQA	486
Kv 1.1	362	AFWWAVVSM	<b>TTV</b>	GYGDMY	380
Kv 4.1	362	AFWYTIVTM	<b>TTV</b>	GYGDIY	380
Shaker	432	AFWWAVVTM	<b>TTV</b>	GYGDMT	450
KcSA	65	ALWWSVETA	<b>TTV</b>	GYGDLY	83

Algunos de los resultados obtenidos con el HCN2 de *X. tropicalis* están dentro de las generalidades reportadas para los canales HCN, por ejemplo el umbral de activación para los HCN se encuentra en un rango de -40 a -80 mV (Biel et al., 2009), similar a lo

observado en este canal de anfibio (-70 mV), sin embargo este umbral puede ser modificado por diferentes factores, por ejemplo, las concentraciones de cAMP intracelulares (Peracchia, 2012), por otro lado los valores obtenidos de  $V_{1/2}$  para este canal HCN2 de rana ( $V_{1/2} = -97$  mV) también corresponden con valores promedio reportados por Altomare et al., 2003; Baruscotti et al., 2009; Wahl y Biel, 2009, De igual manera como sucede con su umbral de activación este valor puede ser modificado al cambiar la concentración extracelular de  $K^+$  de acuerdo con lo reportado por France et al., 1992 y Azene et al., 2003, 2005. También, el  $E_{inv}$  de la corriente del canal HCN2 se encuentra dentro del rango reportado para los canales HCN de -20 a -30 mV (Biel et al., 2009). Una característica más de estos canales y en específico del HCN2 son sus cinéticas lentas de activación y desactivación (Ludwig et al., 1999; Seifert et al., 1999; Altomare et al., 2001; Chen et al., 2001; Xue et al., 2002; Much et al., 2003; Stieber et al., 2003; Whitaker et al., 2007; Ye and Nerbonne, 2009 y Sartiani et al., 2017), que también fueron similares a los mostrados por el HCN2 aislado de *X. tropicalis*. En este trabajo se observaron incrementos en la amplitud de la corriente cuando se aumentó la concentración de  $K^+$  a 97 mM, indicando la preponderancia de permeabilidad a este ion.

Hasta hoy en día se desconoce la relevancia de los residuos LCI aunque anteriormente ya se habían explorado algunos aminoácidos de esta secuencia, por ejemplo, el cambio de cisteína por treonina o serina no modifica la selectividad del canal en HCN2 y HCN4, pero si sus cinéticas de activación (D'Avanzo et al., 2009 y Macri et al 2012); algo similar sucede cuando se muta la S/T por C en la misma posición en canales Kv, en los que la sustitución de los aminoácidos no modifica la selectividad (Zhou y MacKinnon, 2004). La doble mutación de LC por TT en un intento por replicar en su totalidad a un filtro de selectividad a  $K^+$  en HCN4, no es funcional en células CHO, pero, sí se observó su localización en membrana (D'Avanzo et al., 2009).

En este trabajo mostramos que la triple sustitución de los residuos 391LCI393 en HCN2 por alaninas (HCN2Tm), mostró una reducción en la amplitud de las corrientes, así como modificaciones en sus cinéticas de activaciones y desactivación. Posiblemente las alteraciones en la activación se originen a partir de la modificación en la estructura del

poro en la región del filtro de selectividad, previamente se ha demostrado que cambios en estas zonas son capaces de modular la activación de los poros (Zheng, 1997, 1998; Berneche et al., 2005 y D'Avanzo et al., 2009). El modelo *in silico* del HCN2Tm sugiere un aumento del tamaño del poro en estado cerrado de aproximadamente 1.1 Å. D'Avanzo et al. (2009) observaron que la mutación C479T incrementa el tamaño del poro del HCN4 a 1.8 Å.

Como ya se mencionó el K<sup>+</sup> extracelular modula la activación de los HCN. Esta modulación es consistente con lo reportado por Azene et al. (2004) en HCN1 y un tanto diferente a lo encontrado en el HCN2 de *X. tropicalis*, debido a que no se observaron cambios significativos en los umbrales de activación cuando se aumenta la concentración de K<sup>+</sup> extracelular. Sin embargo, cuando se genera la mutación A354T en HCN1 (un aminoácido localizado en el poro del canal), se pierde la modulación por iones externos además de modificar el  $V_{1/2}$  a voltajes más negativos y a su vez acelerando las cinéticas de activación, similar a lo ocurrido en el HCN2Tm.

Los resultados obtenidos con el protocolo de activación muestran disminución en la amplitud de corriente y cambios en la dependencia a voltaje del canal ya que se observa un crecimiento exponencial de la corriente a potenciales muy hiperpolarizantes comparados con los obtenidos del HCN2Wt, modificando su  $V_{1/2}$  a voltajes más negativos, sin alterar el umbral de activación ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, en las curvas de activación del mutante se observa una pequeña proporción de corriente, a voltajes despolarizantes, especialmente cuando se incrementa el K<sup>+</sup> extracelular, lo cual sugiere un canal parcialmente abierto, o quizá solo pueda tratarse de corriente de fuga o es debido al incremento de la corriente instantánea que se observa en el mutante. Un efecto similar se ha encontrado con la mutación S306Q en el dominio S4 del HCN2, el cual modifica las cinéticas de activación, disminuye la amplitud de la corriente, pero aumenta la corriente instantánea y modifica el  $V_{1/2}$  hacia potenciales negativos (Chen et al., 2000).

Utilizando el protocolo de desactivación se obtuvieron pequeñas colas de corriente a voltajes despolarizantes en el HCN2Wt contrastante con lo observado en el mutante, el cual mostró incrementos en la amplitud a estos potenciales. Asimismo, en spHCN se

observó que los canales con la ruptura en el S4 y S4-S5 mostraron pequeñas conductancias en estado estacionario a voltajes despolarizantes donde el spHCN Wt se encuentra cerrado, sugiriendo modificaciones en la compuerta (Flynn y Zagotta, 2018). De igual manera se sabe que el C-linker y el asa S4-S5 están interactuando para mantener el estado cerrado o abierto de la compuerta del HCN2.

La obtención del cristal de HCN1 humano mostró que la compuerta de estos canales se localiza en la parte inferior del dominio S6<sub>C-Term</sub> adyacente al C-linker que conecta la parte intracelular con la transmembranal. La apertura de la compuerta se lleva a cabo mediante un movimiento hacia dentro del sensor de voltaje, que se propaga a través del asa S4-S5 hasta el dominio S5 que está íntimamente ligado al S6, en un acoplamiento de cremallera provocando el desplazamiento del C-linker induciendo la apertura de la compuerta (Lee y Mackinnon, 2017). En un trabajo previo en el laboratorio, el modelo *in silico* sugiere que el cambio en la región del poro provoca una ruptura de una  $\alpha$ -hélice en el C-linker y que debido a esto la estructura que controla la apertura y cierre de la compuerta se puede ver afectada.

Prole y Yellen, (2006) muestran dos regiones funcionales relevantes del canal spHCN1, el asa S4-S5 y el C-linker, las cuales se aproximan durante la activación. Así mismo Chen et al., (2001) mostró que la mutación de dos residuos específicos en el enlazador S4-S5 de HCN2 (Tyr331 y Arg339) impiden el cierre normal del canal presumiblemente por la interrupción de una interacción clave con la compuerta de activación. Posteriormente se mostró que el C-linker interactúa con aminoácidos del S4-S5, donde la eliminación parcial del C-linker sugiere que la interacción de los residuos Arg339 del S4-S5 y Asp443 del C-linker estabilizan el estado cerrado y además participan en la activación de compuerta del canal (Decher et al., 2004). En nuestro modelo se observó una reorientación de los residuos D435, L434 y S436 localizados en el C-linker modificando un poco esta estructura y probablemente afectando algún mecanismo de interacción con la compuerta como se ha mencionado anteriormente cuando se modifican aminoácidos en el C-linker. De esta manera se puede generar una hipótesis en la que el cambio de los residuos 391LCI393 no contribuyen a la permeabilidad a Na<sup>+</sup> del HCN2, pero son importantes en el mantenimiento de las propiedades de compuerta del canal, debido a su hipotética

interacción con otras estructuras que participan en el mecanismo de apertura y cierre. Sin embargo, aún no es claro el mecanismo por el cual los aminoácidos del poro tienen efecto sobre la compuerta. Se requiere mayor evidencia experimental para determinar la relación estructura-función de los residuos del poro, y cómo el cambio en estos aminoácidos modifica las cinéticas de corriente de los canales, o si se trata de un canal con una segunda compuerta de activación como lo propuesto por Azene et al., (2004) y Wah Siu et al., (2009). Sin embargo, estas observaciones no concuerdan con la estructura del cristal del HCN1 donde al igual que los canales de  $K^+$ , el dominio  $S6_{C-Term}$  forma una única compuerta. Es claro que los aminoácidos del poro LCI influyen en el comportamiento de la corriente, sugiriendo afectaciones en la compuerta de acuerdo lo observado en este trabajo y lo reportado también en trabajos previos (Xue y Li, 2002; Azene et al., 2005; Au et al., 2008; Wah Siu et al., 2009).

## 12- Conclusiones

Se logró generar una triple mutación en los residuos 391LCI393>391AAA393 localizados en la región del poro del canal HCN2 de *X. tropicalis*, y expresarlo con éxito en ovocitos de *X. laevis*.

La mutación 391AAA393 evidenció la relevancia de la región LCI. Mediante el uso de nuestro modelo se observaron cambios en el poro, así como en el C-licker, sugiriendo alteraciones en la compuerta del canal. Aun no es claro como estos aminoácidos pueden estar involucrados en el mantenimiento de esta estructura.

Puede sugerirse que el desplazamiento del potencial de inversión de la corriente a potenciales más negativos sea un reflejo de un probable aumento en la permeabilidad a  $K^+$  en el canal mutado, sin embargo, los residuos LCI a pesar de su estratégica localización, no determinan la permeabilidad a  $Na^+$  del HCN2.



### 13- Bibliografia

**Altomare C**, Terragni B, Brioschi C, Milanese R, Pagliuca C, Viscomi A, Baruscotti M, DiFrancesco D. **2003**. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 549 (Pt 2), 347-59.

**Au KW** Siu CW, Lau CP, Tse HF, Li RA. **2008**. Structural and functional determinants in the S5-P region of HCN-encoded pacemaker channels revealed by cysteine-scanning substitutions. *Am J Physiol Cell Physiol* 19,136–141.

**Azene EM**, Sang D, Tsang SY, Li RA. **2005**. Pore-to-gate coupling of HCN channels revealed by a pore variant that contributes to gating but not permeation. *Biochem Biophys Res Commun* 327,1131–1142.

**Azene EM**, Xue T, Li RA. **2003**. Molecular basis of the effect of potassium on heterologously expressed pacemaker (HCN) channels. *J Physiol* 547(Pt 2), 349-356.

**Baruscotti M**, Bucchi A, DiFrancesco D. **2005**. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacol Ther* 107(1), 59-79.

**Berneche S**, Roux B. **2005**. A gate in the selectivity filter of potassium channels. *Structure (Camb)* 13(4), 591–600.

**Berrera**, M., Pantano, S. and Carloni, P. **2006**. cAMP Modulation of the Cytoplasmic Domain in the HCN2 Channel Investigated by Molecular Simulations. *Biophysical Journal* 90(10), 28-33.

**Biel**, M., Wahl-Schott, C., Michalakis, S. and Zong, X. **2009**. Hyperpolarization-Activated Cation Channels: From Genes to Function. *Physiological Reviews* 89(3), 847-885.

**Cerbai E**, Barbieri M, and Mugelli A. **1994**. Characterization of the hyperpolarization-activated current, I(f), in ventricular myocytes isolated from hypertensive rats. *J Physiol* 481, 585–591.

**Chao H**, Fang C, Bo L, Zhian H. **2014**. Neurophysiology of HCN channels: From cellular functions to multiple regulations. *Prog Neurobiol* 112, 1-23.

**Chen J**, Mitchenson JS, Tristani-Firouzi M, Lin M, Sanguinetti MC. **2000**. Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel. *J Biol Chem* 275(46), 65-71.

**Chen J**, Mitchenson JS, Tristani-Firouzi M, Lin M, Sanguinetti MC. **2001**. The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20), 77-82.

**Chia-Hsueh Lee**, Roderick MacKinnon. **2017**. Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel. *Cell*, 111–120.

- Christoforos** Tsantoulas, Sergio Laínez, Sara Wong, Ishita Mehta, Bruno Vilar, Peter A. McNaughton. **2017**. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated 2 (HCN2) ion channels drive pain in mouse models of diabetic neuropathy. *Sci Transl Med* 9 (409), 60-72.
- Chung** Wah Siu, Ezana M. Azene, Ka Wing Au, Chu Pak Lau, Hung Fat Tse, Ronald A. Li. **2009**. State-Dependent Accessibility of the P-S6 Linker of Pacemaker (HCN) Channels Supports a Dynamic Pore-to-Gate Coupling Model. *J Membrane Biol* 230, 35-47.
- Conley**, E. and Brammar, W. **1999**. The ion channel facts book. San Diego: Academic Press.
- Crina** M. Nimigean, Toby W. Allen. **2011**. Origins of ion selectivity in potassium channels from the perspective of channel block. *The Journal of General Physiology* 137 (5), 405-413.
- D'Avanzo** N, Pekhletski R, Backx PH. **2009**. P-Loop Residues Critical for Selectivity in K<sup>+</sup> Channels Fail to Confer Selectivity to Rabbit HCN4 Channels. *PLoS ONE* 4(11), 12-77.
- Decher** N, Chen j, Sanguinetti MC. **2004**. Voltage-dependent gating of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated pacemaker channels: molecular coupling between the S4-S5 and C-linkers. *J Biol Chem* 279(14), 59-65.
- DiFrancesco** D. **1982**. Block and activation of the pace-maker channel in calf purkinje fibres: effects of potassium, cesium and rubidium. *J Physiol* 329, 485–507.
- DiFrancesco** D, Ferroni A, Mazzanti M, and Tromba C. **1986**. Properties of the hyperpolarizing-activated current (I<sub>h</sub>) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 377, 61–88.
- DiFrancesco** D and Tortora P. **1991**. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351, 145–147.
- DiFrancesco** JC, Barbuti A, Milanesi R, Coco S, Bucchi A, Bottelli G, Ferrarese C, Franceschetti S, Terragni B, Baruscotti M. **2011**. Recessive loss-of-function mutation in the pacemaker HCN2 channel causing increased neuronal excitability in a patient with idiopathic generalized epilepsy. *J Neurosci* 31, 27–37.
- DiFrancesco** JC, DiFrancesco D. **2015**. Dysfunctional HCN ion channels in neurological diseases. *Front Cell Neurosci* 6, 174.
- Doyle** D. **1998**. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity. *Science* 280(5360), 69-77.
- Ezana** M. Azene, Dongpei Sang, Suk-Ying Tsang, Ronald A. Li. **2004**. Pore-to-gate coupling of HCN channels revealed by a pore variant that contributes to gating but not permeation. *ELSEVIER* 327(4),1131–1142

**Ezana M, Sang D, Tsang SY, Li RA. 2005.** Pore-to-gate coupling of HCN channels revealed by a pore variant that contributes to gating but not permeation. *Biochem Biophys Res Commun*, 327(4), 31-42.

**Fanjul M. 1998.** *Biología funcional de los animales*, México: Siglo Veintiuno, 1st ed., 15-63.

**Fernández-Mariño Ana I. , Tyler J. Harpole, Kevin Oelstrom, Lucie Delemotte y Baron Chanda. 2018.** Gating interaction maps reveal a noncanonical electromechanical coupling mode in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Nature Structural and Molecular Biology* 25, 320-326.

**Flynn GR y Zagotta WN. 2018.** Insights into the molecular mechanism for hyperpolarization-dependent activation of HCN channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(34), 86-95.

**Frace A. M., Maruoka, F. Noma, A. 1992.** External K increases Na conductance of the hyperpolarization-activated current in rabbit cardiac pacemaker cells. *Pflugers Arch* 421, 97.

**Haitin Y. 2014.** Structural biology: A 'funny' cyclic dinucleotide receptor. *Nature Chemical Biology* 10(6), 413-414.

**Huang Z., Lujan, R., Kadurin, I., Uebele, V., Renger, J., Dolphin, A. and Shah, M. 2011.** Presynaptic HCN1 channels regulate CaV3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nature Neuroscience* 14(4), 478-486.

**Huang Z., Walker, M. and Shah, M. 2009.** Loss of Dendritic HCN1 Subunits Enhances Cortical Excitability and Epileptogenesis. *Journal of Neuroscience* 29(35), 79-88.

**Jeremy M. Berg, John L., Tymoczko, Lubert Stryer. 2007.** *Bioquímica. versión en español por: Prof. Dr. Jose M. Mcarulla; Barceclona, España. Editorial Reverté.*

**John Cowgill, Vadim A. Klenchin , Claudia Alvarez-Barón , Debanjan Tewari , Alexander Blair, y Baron Chanda. 2019.** Bipolar switching by HCN voltage sensor underlies hyperpolarization activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 116(2), 670–678.

**Kase D e Imoto K. 2012.** The Role of HCN Channels on Membrane Excitability in the Nervous System. *J Signal Transduct* 61, 47-97.

**Kole M., Bräuer, A. and Stuart, G. 2007.** Inherited cortical HCN1 channel loss amplifies dendritic calcium electrogenesis and burst firing in a rat absence epilepsy model. *The Journal of Physiology* 578(2), 507-525.

**Kratochvil H., Carr, J., Matulef, K., Annen, A., Li, H., Maj, M., Ostmeier, J., Serrano, A., Raghuraman, H., Moran, S., Skinner, J., Perozo, E., Roux, B., Valiyaveetil, F. and Zanni, M. 2016.** Instantaneous ion configurations in the K<sup>+</sup> ion channel selectivity filter revealed by 2D IR spectroscopy. *Science* 353, 1040-1044.

- Ludwig A. 2003.** Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *The EMBO Journal* 22(2), 216-224.
- Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, and Biel M. 1999.** Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J* 18, 2323–2329.
- Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A, and DiFrancesco D. 1993.** Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol* 69, 2129–2136.
- Macri V, Angoli D, and Accili EA. 2012.** Architecture of the HCN selectivity filter and control of cation permeation. *Sci Rep*, 2-894.
- Marshall CR and Accili EA. 2007.** Evolution and structural diversification of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel genes. *Physiol Genomics* 29, 231–245.
- Martin Biel, Angela Schneider y Christian Wahl. 2002.** Cardiac HCN Channels: Structure, Function, and Modulation. *ELSEVIER* 12, 206-213.
- Martínez Martin Rosas. 2004.** Los canales iónicos: la biología y patología. *Archivos de Cardiología de Mexico*, 2-7.
- Ng LC, Putrenko I, Baronas V, Van Petegem F, y Accili EA. 2016.** Cyclic purine and pyrimidine nucleotides bind to the HCN2 ion channel and variably promote C-terminal domain interactions and opening. *Structure*. 24(10) 1629 – 1642.
- Noam Y., Bernard, C. and Baram, T. 2011.** Towards an integrated view of HCN channel role in epilepsy. *Current Opinion in Neurobiology* 21(6), 873-879.
- Peracchia C. 2012.** *Handbook of Membrane Channels*. Burlington: Elsevier Science.
- Postea O. and Biel, M. 2011.** Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*. 10 (12): 903-14.
- Prole DL and Yellen G. 2006.** Reversal of HCN channel voltage dependence via bridging of the S4-S5 linker and Post-S6. *J Gen Physiol* 128, 273–282.
- Robinson R. and Siegelbaum, S. 2003.** Hyperpolarization-Activated Cation Currents: From Molecules to Physiological Function. *Annual Review of Physiology* 65(1), 453-480.
- Saldaña-Meyer R.** Caracterización del papel fisiológico de los canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos en el riñón de rata. **2009.** Que para obtener el título de M. en C. Química. Programa de maestría y postgrado en ciencias bioquímicas. UNAM.
- Sanner M.F., Olson A.J., Spehner J.C. 1996.** Reduced surface: an efficient way to compute molecular surfaces, *Biopolymers* 38, 305-320.

**Laura Sartiani, Guido Mannaioni, Alessio Masi, Maria Novella Romanelli y Elisabetta Cerbai Christopher J. Garland. 2017.** The Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels: from Biophysics to Pharmacology of a Unique Family of Ion Channels. *Pharmacological Reviews* 69 (4), 354-395.

**Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, and Kaupp UB. 1999.** Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 91–96.

**Spinelli V., Sartiani, L., Mugelli, A., Romanelli, M. N., y Cerbai, E. 2018.** Hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated channels: pathophysiological, developmental, and pharmacological insights into their function in cellular excitability. *Can. J. Physiology and Pharmacology*, 1-8.

**Stieber J, Thomer A, Much B, Schneider A, Biel M, and Hofmann F. 2003.** Molecular basis for the different activation kinetics of the pacemaker channels HCN2 and HCN4. *J Biol Chem* 278, 72–80.

**Villafuerte Ojeda, M. 2016.** CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE CANALES HCN2 DE *Xenopus tropicalis*. Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México 1-50.

**Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR. 2014.** Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 11(6839), 805-10.

**Wahl-Schott C y Biel M. 2009.** HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci* 66(3), 470-94.

**Xue T y Li RA. 2002.** An external determinant in the S5-P linker of the pacemaker (HCN) channel identified by sulfhydryl modification. *J Biol Chem* 277, 33–42.

**Yang Q., Kuzyk, P., Antonov, I., Bostwick, C., Kohn, A., Moroz, L. and Hawkins, R. 2015.** Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channels in *Aplysia*: Contribution to classical conditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(52), 30-35.

**Zheng J y Sigworth FJ. 1997.** Selectivity changes during activation of mutant Shaker potassium channels. *J Gen Physiol* 110(2), 101–117.

**Zheng J y Sigworth FJ. 1998.** Intermediate conductances during deactivation of heteromultimeric Shaker potassium channels. *The Journal of General Physiology* 112 (4), 457-474.

**Zhou M y Mackinnon R. 2004.** A mutant KcsA channel with altered conduction properties and selectivity filter ion distribution. *J Mol Biol* 338(4), 39-46.

**Zolles G, Klöcker N, Wenzel D, Weisser-Thomas J, Fleischmann BK, Roeper J, Fakler B. 2006.** Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides. *Neuron* 52(6), 1027-36.

## 14- Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Corriente generada por HCN en células HEK293 en la modalidad de control de voltaje.	9
Figura 2. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región del poro del HCN2.	10
Figura 3. Características estructurales de los canales HCN.	11
Figura 4. Estructura del filtro de selectividad.	13
Figura 5. Compuerta dependiente de voltaje.	14
Figura 6. Modulación de la activación de la corriente por cAMP.	15
Figura 7. Modulación por cAMP.	16
Figura 8. Estructura in silico del HCN2Wt y mutaciones puntuales de la región LCI.	19
Figura 9. Modelado in silico del HCN2 de <i>X. tropicalis</i> .	29
Figura 10. Modelado in silico HCN2Wt y Tm.	30
Figura 11. Modelado in silico de la región del poro de HCN2.	31
Figura 12. Estructura de la cavidad interna del poro y análisis de superficie.	33
Figura 13. Análisis de trayectoria.	34
Figura 14. Mapa funcional y de restricción del pGEMT-Easy-HCN2Tm.	36
Figura 15. Mapa funcional y de restricción del pJET-HCN2Wt.	37
Figura 16. mRNA obtenido de la transcripción in vitro.	37
Figura 17. Corriente subyacente del canal HCN2Wt y Tm.	38
Figura 18. Registros electrofisiológicos obtenidos con la sustitución iónica.	41
Figura 19. Selectividad del canal en la triple mutación 391LCI393 > 391AAA393.	43
Figura 20. Potencial de inversión y sustitución del Na <sup>+</sup> .	44
Figura 21. Constante de tiempo de activación y cierre del HCN2Wt.	45
Figura 22. Constante del tiempo de activación y cierre del HCN2Tm.	46

## 15- Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Secuencia de aminoácidos.	22
Tabla 2. Reactivos para protocolo de mutagénesis.	23
Tabla 3. Condiciones de PCR.	23
Tabla 4. Soluciones para experimentos de sustitución iónica	27
Tabla 5. Resumen de datos obtenidos con el HCN2Wt y Tm.	47

